

屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的研究

金 东, 于 波, 叶长芸, 刘 凯, 侯雪新, 孙渭歌, 徐建国, 李振军

摘要:目的 建立屎肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。方法 根据屎肠球菌的 *ddl* 基因设计 TaqMan 荧光定量 PCR 特异的引物及探针, 在多种常见致病菌及条件致病菌中检测其特异性; 将目的基因克隆到 pMD18-T 载体中建立标准曲线, 检测方法的灵敏度和稳定性; 使用腹水模拟标本验证方法的应用性。结果 在特异性评价中, 除了阳性对照外其余菌株均未见特异性扩增曲线。建立屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的标准曲线, 确定本方法对质粒标准品的检测下限为 20 copy/管。通过对 1.0×10^7 、 1.0×10^5 和 1.0×10^3 3 个浓度质粒标准品的重复检测, 确定屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的组内变异系数为 1.90%~3.91%; 组间变异系数为 1.52%~1.69%。应用屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对含菌量为 $1.6 \times 10^0 \sim 1.6 \times 10^8$ cfu/mL 浓度梯度的腹水模拟标本进行检测, 其检测灵敏度为 1.6×10^2 cfu/mL。结论 本研究建立了屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。

关键词: 屎肠球菌; TaqMan 荧光定量 PCR; 标准曲线

中图分类号: R378.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2013)06-0551-05

TaqMan real-time PCR detection of *Enterococcus faecium*

JIN Dong, YU Bo, YE Chang-yun, LIU Kai, HOU Xue-xin, SUN Wei-ge, XU Jian-guo, LI Zhen-jun

(State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

ABSTRACT: To establish TaqMan real-time PCR assay of *Enterococcus faecium* and provide reliable technical basis for clinical application, we designed the primers and probe of *Enterococcus faecium* according to *ddl* gene and detected the specificity in common pathogens and conditioned pathogens. The target gene was cloned to pMD18-T vector to build the standard curve of this method. We made the ascites simulation specimens with the concentrations from $1.6 \times 10^0 - 1.6 \times 10^8$ cfu/mL by 10 series dilutions of *Enterococcus faecium* strain and mixing well with sterile ascites to evaluate the application in clinical lab. The target gene was positive in *Enterococcus faecium* standard strain and clinical isolates but negative in other pathogens and conditioned pathogens by TaqMan real-time PCR assay. According to the standard curve, we acquired the sensitivity of this method was 20 copy/reaction. The stability evaluation indicated that the inter and intra-assay coefficients of variability were 1.52%~1.69% and 1.90%~3.91%, respectively. The sensitivity of TaqMan real-time PCR assay of the ascites simulation specimens was 1.6×10^2 cfu/mL. In conclusion, the TaqMan real-time PCR assay developed in our study could be used in the detection of *Enterococcus faecium* in ascites specimens.

KEY WORDS: *Enterococcus faecium*; TaqMan real-time PCR; standard curve

Supported by the National Science and Technology Key Project for Communicable Disease Prevention and Control (No. 2011ZX10004-001, No. 2012ZX10004-501), and the Special Program for Science Research in Healthcare industry (No. 201302006)

Corresponding author: Li Zhen-jun, Email: lizhenjun@icdc.cn

屎肠球菌是人类胃肠道常见的细菌之一, 广泛存在于土壤、水、动物(鸟类、昆虫)中。虽然很少引起正常人的感染性疾病, 但是屎肠球菌是院内感染的常见病原菌。最近十年, 在美国、欧洲和南美多个

国家中由屎肠球菌引起感染的比例逐年升高^[1-2]。由于屎肠球菌对多种一线抗生素包括青霉素和万古霉素耐药, 其引起的感染通常难以应对。与粪肠球菌相比, 屎肠球菌更易获得新的耐药表型, 我国在 2010 年就检测到两株携带 NDM-1 耐药基因的屎肠球菌。d-丙氨酸聚连接酶基因(*ddl* 基因)作为屎肠球菌的保守基因, 广泛用于屎肠球菌的检测工作^[3-5], 本研究根据 *ddl* 基因设计引物及探针建立屎

国家科技重大专项(No. 2011ZX10004-001, No. 2012ZX10004-501)
卫生科研行业专项(No. 201302006)联合资助
通讯作者: 李振军, Email: lizhenjun@icdc.cn
作者单位: 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验用菌株 尿肠球菌参考菌株 ATCC BAA-472 和粪肠球菌参考菌株 ATCC 51299 购自 ATCC。肠球菌临床分离株分离自粪便、尿液、血液、阴道分泌物等样品,分离株均经过梅里埃 API 细菌生化鉴定系统鉴定。用于特异性评价的菌株核酸包括坚忍肠球菌、鸟肠球菌、肠致病性大肠埃希菌 (EPEC)、肠产毒性大肠埃希菌 (ETEC)、肠侵袭性

大肠埃希菌 (EIEC)、肠出血性大肠埃希菌 (EHEC)、肠聚集性大肠埃希菌 (EAEC)、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌、宋内志贺菌、甲型副伤寒沙门菌、肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、杨氏枸橼酸杆菌、布氏枸橼酸杆菌、阴沟肠杆菌、粘质沙雷菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、唾液链球菌、缓症链球菌、血链球菌、巴黎链球菌、小肠结肠炎耶尔森菌、铜绿假单胞菌、嗜水气单胞菌、单增李斯特菌、空肠弯曲菌、幽门螺杆菌、艰难梭菌、脆弱拟杆菌等。具体菌株信息见表 1。

表 1 实验用菌株信息

Tab.1 The information of the strains used in this study

| 序号 No. | 菌株名称 Strain | 拉丁名 In Latin | 菌株来源 Source | 菌株数量 No. strain |
|-----------|----------------|----------------------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | 尿肠球菌 | <i>Enterococcus faecium</i> | BAA-472 | 1 |
| 2 | 尿肠球菌 | <i>Enterococcus faecium</i> | Isolates | 85 |
| 3 | 粪肠球菌 | <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 51299 | 1 |
| 4 | 粪肠球菌 | <i>Enterococcus faecalis</i> | Isolates | 26 |
| 5 | 坚忍肠球菌 | <i>Enterococcus durans</i> | Isolates | 4 |
| 6 | 鸟肠球菌 | <i>Enterococcus avium</i> | Isolates | 4 |
| 7 | 肺炎链球菌 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Isolates | 1 |
| 8 | 酿脓链球菌 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | Isolates | 1 |
| 9 | 口腔链球菌 | <i>Streptococcus oralis</i> | Isolates | 1 |
| 10 | 缓症链球菌 | <i>Streptococcus mitis</i> | Isolates | 1 |
| 11 | 血链球菌 | <i>Streptococcus sanguis</i> | Isolates | 1 |
| 12 | 唾液链球菌 | <i>Streptococcus salivarius</i> | Isolates | 1 |
| 13 | 巴黎链球菌 | <i>Streptococcus lutetiensis</i> | Sequenced strains | 1 |
| 14 | 福氏志贺菌 | <i>Shigella flexneri</i> | Sequenced strains | 1 |
| 15 | 痢疾志贺菌 | <i>Shigella dysenteriae</i> | CMCC 51329 | 1 |
| 16 | 鲍氏志贺菌 | <i>Shigella boydii</i> | CMCC 51105 | 1 |
| 17 | 宋内氏志贺菌 | <i>Shigella sonnei</i> | Sequenced strains | 1 |
| 18 | 肠致病性大肠埃希菌 | <i>Enteropathogenic E. coli</i> | 2348/69 | 1 |
| 19 | 肠产毒性大肠埃希菌 | <i>Enterotoxigenic E. coli</i> | 10407 | 1 |
| 20 | 肠出血性大肠埃希菌 | <i>Enterohemorrhagic E. coli</i> | EDL 933 | 1 |
| 21 | 肠侵袭性大肠埃希菌 | <i>Enteroinvasive E. coli</i> | 44825 | 1 |
| 22 | 肠聚集性大肠埃希菌 | <i>Enteroggregative E. coli</i> | O42 | 1 |
| 23 | 伤寒沙门氏菌 | <i>Salmonella typhi</i> | Isolates | 1 |
| 24 | 肺炎克雷伯菌 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Isolates | 1 |
| 25 | 奇异变形杆菌 | <i>Proteus mirabilis</i> | Isolates | 1 |
| 26 | 弗劳地枸橼酸杆菌 | <i>Citrobacter freundii</i> | Sequenced strains | 1 |
| 27 | 布氏枸橼酸杆菌 | <i>Citrobacter braakii</i> | Isolates | 1 |
| 28 | 杨氏枸橼酸杆菌 | <i>Citrobacter youngae</i> | Isolates | 1 |
| 29 | 阴沟肠杆菌 | <i>Enterobacter cloacae</i> | Isolates | 1 |
| 30 | 粘质沙雷菌 | <i>Serratia marcescens</i> | 1. 1857 | 1 |
| 31 | 副溶血性弧菌 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | ATCC 17802 | 1 |
| 32 | 金黄色葡萄球菌 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 | 1 |
| 33 | 小肠结肠炎耶尔森菌 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | ATCC 23715 | 1 |
| 34 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 15442 | 1 |
| 35 | 嗜水气单胞菌 | <i>Aeromonas hydrophila</i> | 1. 2017 | 1 |
| 36 | 单增李斯特菌 | <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC 54003 | 1 |
| 37 | 空肠弯曲菌 | <i>Campylobacter jejuni</i> | Isolates | 1 |
| 38 | 艰难梭菌 | <i>Clostridium difficile</i> | Isolates | 1 |
| 39 | 脆弱拟杆菌 | <i>Bacteroides fragilis</i> | ATCC 25285 | 1 |
| 40 | 洋葱伯克霍尔德菌 | <i>Burkholderia cepacia</i> | Isolates | 1 |
| 41 | 类志贺邻单胞菌 | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | 1. 1998 | 1 |
| 42 | 猪链球菌 | <i>Streptococcus suis</i> | Sequenced strains | 1 |
| 43 | 鲍曼不动杆菌 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Isolates | 1 |
| 44 | 幽门螺杆菌 | <i>Helicobacter pylori</i> | Isolates | 1 |

1.1.2 主要试剂与仪器设备 Premix Ex TaqTM、EasyDilution、pMD18-T 载体、JM109 感受态细胞以及小量质粒提取试剂盒购自大连宝生物工程公司。核酸提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)和胶回收试剂盒(Qiaquick Gel Extraction kit)购自德国 QIAGEN 公司。脑心浸液液体培养基及细菌琼脂粉购于北京陆桥技术有限公司。Nano-Drop ND-1000 分光光度计为美国 Thermo 公司产

品。ABI 7900 HT PCR 仪为美国应用生物系统公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的合成 根据尿肠球菌 *ddl* 基因的保守区域应用 Primer Express3.0 软件设计引物与探针,具体信息见表 2。引物与探针均由上海基康生物公司合成。

表 2 尿肠球菌引物及探针序列

Tab. 2 The probe and primers of *E. faecium*

| 引物及探针名称 Probe or primer | 序列 Sequence | 长度/bp Length | Tm 值 Tm value |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------|
| Efm <i>ddl</i> -F | GAAAGATGTCGCTTTCTATGATTATGA | 27 | 58.1 |
| Efm <i>ddl</i> -R | CCGGCTCAATCCGCTTCCACCTA | 23 | 58.6 |
| Efm probe | HEX-ATGCAGATTCCAGCCGAAGTGCC-BHQ | 23 | 67.3 |

1.2.2 质粒标准品的制备 1)以 Efm *ddl*-F 和 Efm *ddl*-R 为引物,扩增片段大小为 154 bp 的目的基因;2)切胶回收,纯化 PCR 产物;3)连接到 pMD18-T 载体;4)转化到 JM109 感受态细胞,取 100 μ L 涂布于氨苄抗性的脑心浸液培养基上;5)挑取过夜培养的克隆接种于 5 mL 脑心浸液液体培养基中,摇菌过夜;6)提取质粒,用 M13+/-通用引物进行阳性克隆子的验证;7)测序。

1.2.3 质粒拷贝数换算 测定质粒 DNA 的浓度为 153.4 ng/ μ L,根据质粒的分子质量将质粒样品浓度换算为拷贝数:每 μ L 样品中检测基因的拷贝数=浓度 (ng/ μ L) \times 阿佛加德罗常数 $\times 10^{-9}$ /(660 \times 重组质粒碱基数)。依此计算得到质粒拷贝数浓度为 4.4×10^{10} 拷贝/ μ L。

1.2.4 标准曲线的建立 用 EasyDilution 将上述质粒连续 10 倍稀释至 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/ μ L,共 9 个浓度梯度,每个浓度进行 3 次重复测定。

1.2.5 腹水模拟标本的制备及核酸提取 1)尿肠球菌标准菌株 BAA-472 接种于脑心浸液液体培养基中,过夜震荡培养。将过夜培养后的 50 μ L 菌液接种于 5 mL 脑心浸液液体培养基中,摇菌至 OD (610 nm)值为 0.58,平板计数为 3.3×10^8 cfu/mL;2)用磷酸盐缓冲液连续 10 倍稀释为 $3.3 \times 10^0 \sim 3.3 \times 10^7$ cfu/mL;3)取无菌腹水 100 μ L/管,分别加入 100 μ L 不同浓度的尿肠球菌稀释悬液,制成 $1.6 \times 10^0 \sim 1.6 \times 10^8$ cfu/mL 梯度浓度的腹水模拟标本;4)5 000 g 离心 10 min,弃上清,应用 QIAamp 核酸提取试剂盒提取模拟标本核酸,每个菌量浓度

取 3 份腹水模拟标本,平行独立提取 DNA,同时提取未加入尿肠球菌的腹水标本作为阴性对照。

1.2.6 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的反应体系 TaqMan 荧光定量 PCR 反应总体系为 20 μ L,含 2 \times Premix Ex TaqTM 10 μ L、10 umol/L 的上下游引物各 0.4 μ L、探针 0.2 μ L、DNA 模板 2 μ L,加去离子水至 20 μ L。在 ABI 7900HT PCR 仪上扩增并测定结果,PCR 参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40 个循环。阴性对照为未加入尿肠球菌的腹水标本提取物。扩增结束后,扣除本底荧光信号后取同一阈值分析数据,确定各样本的 Ct(cycle threshold)值。

1.2.7 特异性评价 使用本方法对常见致病菌及条件致病菌的基因组 DNA 进行检测,评价该 TaqMan 荧光定量 PCR 法的特异性。

1.2.8 灵敏度及稳定性评价 用 TaqMan 荧光定量 PCR 法分别检测 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/ μ L 的质粒标准品和 $1.6 \times 10^0 \sim 1.6 \times 10^8$ cfu/mL 的腹水模拟标本,评价方法的检测灵敏度。对浓度为 1.0×10^7 、 1.0×10^5 及 1.0×10^2 的质粒标准品一个批次内重复检测 10 次以计算其组间变异系数;不同批次重复检测 10 次以计算其组间变异系数。

2 结果

2.1 尿肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性 除阳性对照外,在表 1 中列出的其它 41 种常见致病菌及条件致病菌,包括肠球菌属中其他常见种如:粪肠球菌、鸟肠球菌和坚韧肠球菌中均未检测到

特异的扩增曲线。

2.2 屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法标准曲线的建立 对 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/ μL 共 9 个浓度梯度的质粒标准品重复检测 3 次, 建立屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的标准曲线。当质粒标准品的浓度为 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/ μL 时, 质粒浓度的对数值与其 Ct 值之间呈良好的线性关系, 求出相关系数 $R^2 = 0.997\ 94$, 确定其 Threshold 值为 0.012 4, 结果见图 1。当质粒浓度为 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝/ μL 时, 所有标本的扩增荧光信号强度均高于检测阈值; 而当质粒浓度为 1.0×10^0 拷贝/ μL 时, 3 个平行样本均未出现特异性扩增。依据每反应体系加 2 μL 模板计算可知, 本研究建立的粪肠球菌实时荧光 PCR 体系的对质粒标准品的检测下限为 20 拷贝/反应体系, 见图 1。

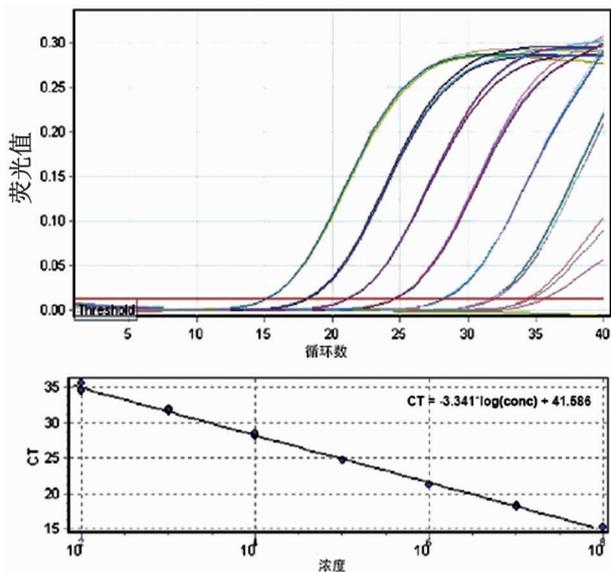


图 1 屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for plasmid standard by TaqMan real-time PCR assay of *Enterococcus faecium*

2.3 屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的组内和组间特异性 分别选取高、中、低 3 个浓度的质粒标准品进行重复检测以确定本方法的组内和组间变异系数。在同一批次试验中重复检测 1.0×10^7 、 1.0×10^5 和 1.0×10^3 3 个浓度的质粒标准品 10 次, 计算其组内变异系数为 1.90%~3.91%; 不同批次重复检测 1.0×10^7 、 1.0×10^5 和 1.0×10^3 3 个浓度的质粒标准品 10 次, 确定其组间变异系数为 1.52%~1.69%。

2.4 屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对腹水模拟标本检测的灵敏度 当腹水模拟标本的含菌量为 $1.6 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^8$ cfu/mL 时, 所有标本的扩增

荧光信号强度均高于检测阈值; 当标本含菌量为 1.6×10^1 cfu/mL 时, 3 个平行样中均未出现特异性扩增, 因此, 本研究建立的屎肠球菌 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对粪便模拟标本的检测下限为 1.6×10^2 cfu/mL。

3 讨论

屎肠球菌作为条件致病菌可引起泌尿系统、腹腔、伤口等感染, 亦可引起心内膜炎和菌血症等。近年来由于免疫抑制剂的广泛使用, 过度使用抗生素等原因, 屎肠球菌所致的感染比例逐年增加, 已成为医院感染的主要病原菌之一。在医院内, 耐药屎肠球菌可在患者之间传播, 护士及其他医务人员亦可携带耐药屎肠球菌, 是造成医院感染的重要原因。耐药的屎肠球菌, 特别是耐万古霉素的屎肠球菌 (Vancomycin-resistant *E. faecium*, VRE) 已经成为重要的公共卫生问题。法国有多起耐万古霉素屎肠球菌感染暴发的报道, 其中包括 2004 年一起感染 38 名住院病人的暴发^[6-8]。近年来, 我国多个地区亦分离到耐万古霉素的屎肠球菌^[9-10]。

目前临床分离和鉴定屎肠球菌仍然使用常规的细菌分离培养和生化鉴定方法, 虽然屎肠球菌营养要求低, 易于生长, 但是常规方法耗时长, 主观因素影响大, 且采样前使用抗生素也容易导致培养的阴性。相对于常规的鉴定方法, 荧光定量 PCR 方法由于其灵敏度高、特异性强、耗时短、自动化程度高等特点, 广泛用于多种病原菌的检测工作^[11-12]。本研究根据屎肠球菌的保守基因设计引物和探针, 建立屎肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 并使用腹水模拟标本进行了模拟实验。

在特异性评价中, 多种常见致病菌及条件致病菌包括粪肠球菌, 鸟肠球菌和坚韧肠球菌中均未检测到特异的扩增曲线, 证明本方法的特异性好。将目的片段克隆后建立屎肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的标准曲线, 通过标准曲线可知本方法对质粒标准品的检测下限为 20 拷贝/反应体系。通过对高、中、低 3 个浓度的质粒标准品的重复检测, 确定本方法的组内变异系数为 1.90%~3.91%; 组间变异系数为 1.52%~1.69%, 证明本研究建立的屎肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法稳定性好。为了临床的应用我们制作了腹水模拟标本, 通过对不同菌浓度的模拟标本的检测证实本方法的检测灵敏度为 1.6×10^2 cfu/mL。本研究初步建立了屎肠球菌的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法, 并在模拟标本中检测了其灵敏度, 但是其在临场实践中的应用还

有待进一步的证实。

参考文献:

- [1] Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(5): 454-460.
- [2] Panesso D, Reyes J, Rincon S, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multi-center study in South American hospitals[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(5): 1562-1569.
- [3] Brigante G, F Luzzaro, A Bettaccini, et al. Use of the Phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3263-3267.
- [4] Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5857-5860.
- [5] Yean CY, Yin LS, Lalitha P, et al. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species[J]. *BMC Microbiol*, 2007, 7: 112.
- [6] Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, et al. First nosocomial outbreak of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 3642-3649.
- [7] Lesens O, Mihaila L, Robin F, et al. Outbreak of colonization and infection with vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a French university hospital[J]. *Infect Ctrl Hosp Epidemiol*, 2006, 27(9): 984-986.
- [8] Lucet JC, Armand-Lefevre L, Laurichesse JJ, et al. Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital[J]. *J Hosp Infect*, 2007, 67(1): 42-48.
- [9] Li CY, Yang Q. Surveillance of antimicrobial resistance and vancomycin resistance genes in *Enterococcus* species [J]. *Chin J Health L Technol*, 2007, 17(12): 2244-2246. (in Chinese)
李春艳, 杨青. 肠球菌耐药性及万古霉素耐药基因研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(12): 2244-2246.
- [10] Zhu DM, Wang F, Zhang YY. Surveillance of bacterial resistance in hospitals of Shanghai during 2005[J]. *Chin J Infect and Chemotherapy*, 2006, 6(6): 371-376. (in Chinese)
朱德妹, 汪复, 张婴元. 2005年上海地区细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2006, 6(6): 371-376.
- [11] Wang Y, Zhao AL, Ye CY. Real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in simulated clinical sample [J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(6): 511-514. (in Chinese)
王艳, 赵爱兰, 叶长芸. 荧光定量 PCR 技术用于模拟临床标本单增李斯特菌检测的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(6): 511-514.
- [12] Meng S, Bai XM, Wang Y, et al. Novel triplex real-time TagMan PCR assay for the detection of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2012, 28(12): 217-222. (in Chinese)
孟双, 白雪梅, 王艳, 等. 嗜水气单胞菌实时荧光三重 TaqMan PCR 快速检测体系的建立[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(12): 217-222

收稿日期: 2013-03-11; 修回日期: 2013-05-11

本刊承接与医药卫生、兽医兽药、医疗器械有关的产品及生物制品、保健品的广告业务, 所登载广告可在本刊网站同时发布。

联系电话: 0591-87552018; 传真: 0591-87563582