

# PCR-HRM 方法分析 16S rRNA 基因 进行细菌鉴定的可行性研究\*

邱会茹<sup>1</sup>, 王佳琳<sup>1</sup>, 薛文成<sup>2a</sup>, 杨婧<sup>2b</sup>, 任微<sup>2a</sup> (1. 锦州医科大学北部战区总医院  
研究生培养基地, 辽宁锦州 121000; 2. 北部战区总医院 a. 检验科; b. 感染控制科, 沈阳 110016)

**摘要:**目的 建立一种基于 16S rRNA 基因进行聚合酶链式-高分辨率熔解曲线(PCR-HRM)分析方法,用于快速鉴定临床常见感染细菌。方法 收集中国人民解放军北部战区总医院 2017 年 8 月~2018 年 10 月期间临床分离的 167 株常见细菌,选取 16S rRNA 三个高度保守区域(V1, V3, V6)基因序列用于引物设计,在含有饱和荧光染料的体系中进行 PCR-HRM 分析以区分不同细菌种属。将 167 株实验菌分为葡萄球菌、链球菌、非发酵阴性杆菌以及其它常见临床分离菌四组进行实验,分别进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和 PCR-HRM 分析并对结果进行对比,不一致的鉴定结果以测序为金标准。同时进行 PCR-HRM 方法鉴定临床常见病原菌的灵敏度、重复性和盲法验证试验。结果 PCR-HRM 方法与 MALDI-TOF MS 对 167 株临床常见分离菌鉴定正确率分别为 98.2% 和 97.0%,这两种方法无明显统计学差异( $\chi^2=1.97, P=0.727>0.05$ )。PCR-HRM 方法可检测 2 pg/ $\mu$ l 的模板浓度;将 6 株革兰阴性菌分成一式三份同时进行 PCR-HRM 重复性试验,同种实验菌的三份熔解曲线图完全聚类;其盲法验证实验准确率 100%。结论 该方法通过使用 3 对 16S rRNA 引物构造多重差异曲线可对临床常见细菌进行分类到属级甚至种级,且灵敏度高、特异性强,可以作为鉴定临床常见感染菌的新选择。

**关键词:**细菌感染;细菌鉴定;高分辨熔解曲线;16S rRNA

中图分类号:R378;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)03-037-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.03.009

## Feasibility Study on Analysis of 16S rRNA Gene for Bacterial Identification by PCR-HRM Method

QIU Hui-ru<sup>1</sup>, WANG Jia-lin<sup>1</sup>, XUE Wen-cheng<sup>2a</sup>, YANG Jing<sup>2b</sup>, REN Wei<sup>2a</sup> (1. Postgraduate  
Training Base of General Hospital of Northern Theater Command of Jinzhou Medical University,  
Liaoning Jinzhou 121000 China; 2a. Department of Clinical Laboratory; 2b. Department of  
Infection Control, the General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Objective A polymerase chain reaction-high resolution melting curve analysis (PCR-HRM) method based on 16S rRNA gene was developed for rapid identification of common clinical infected bacteria. **Methods** 167 common bacteria isolated clinically from August 2017 to October 2018 in the General Hospital of Northern Theater Command of the Chinese People's Liberation Army, and three highly conserved regions (V1, V3, V6) of GenBank were selected for primer design. PCR-HRM analysis in systems containing saturated fluorescent dyes to distinguish between different bacterial species. 167 strains were divided into four groups: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, non-fermentative negative bacilli and other common clinical isolates. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and PCR-HRM analysis were performed and the results were compared. The inconsistent results were determined by sequencing as the gold standard. The sensitivity, specificity and reproducibility of HRMA method for identification of common clinical pathogens were evaluated. **Results** The correct rate of identification between PCR-HRM and MALDI-TOF MS was 98.2% and 97.0%, respectively. There was no significant difference between the two methods ( $\chi^2=1.97, P=0.727>0.05$ ). The template concentration of 2 pg/ $\mu$ l could be detected by PCR-HRM method, and 6 Gram-negative bacteria were divided into three strains and the PCR-HRM repeatability test was carried out at the same time, and the three fusion curves of the same tested bacteria were completely clustered, and the accuracy of the experiment was 100% by blind method. **Conclusion** By using 3 pairs of 16S rRNA primers to construct multiple differential curves, common clinical bacteria can be classified to genus or even species, with high sensitivity and specificity, which can be used as a new choice for identification of common clinical infective bacteria.

**Keywords:** bacterial infection; identification of bacteria; high resolution melting curve; 16S rRNA

目前临床上引起感染的病原菌种类繁多,传统床诊断的需要。操作简单、准确的诊断方法对于病  
表型等鉴定方法已不足以满足细菌感染性疾病临病原菌的早期鉴定十分重要<sup>[1]</sup>。一个快速、可靠的诊

\* 作者简介:邱会茹(1993-),女,硕士研究生,研究方向:微生物与分子生物学,E-mail:1842747096@qq.com。

通讯作者:任微,女,医学学士,研究方向:微生物学,E-mail:renwei0910@163.com。

断平台,可以提供广泛的病原菌筛查和特定的感染性细菌鉴定,对于实现感染性疾病的早期诊断、科学指导患者进行个体化抗生素治疗具有重大意义<sup>[2-3]</sup>。

近年来,PCR扩增产物的高分辨溶解曲线(HRM)分析技术有望为临床常见感染菌的鉴定提供一种快速、经济的鉴定方法<sup>[4]</sup>。目前,16S rRNA不同结构域在细菌鉴定中的功能已得到明确分析和广泛认可,已有多篇研究报道16S rRNA可用于鉴定临床分离菌<sup>[5]</sup>。本文对基于16S rRNA基因进行HRM分析鉴定细菌的可行性进行研究,以实现常见临床感染菌的早期诊断及治疗。

## 1 材料和方法

1.1 菌株来源 收集中国人民解放军北部战区总医院2017年8月~2018年10月期间临床分离的167株常见细菌(同一患者同一部位相同细菌做一次计数),菌株标本类型分布:尿液68株,痰49株,血液30株,引流液13株和导管7株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,铜绿假单胞菌 ATCC 27853,大肠埃希菌 ATCC 25922,均购于国家卫健委临床检验中心。

1.2 试剂与仪器 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司),Light Cyclers 480 High Resolution Melting Master PCR 扩增试剂盒(瑞士罗氏公司),3对扩增引物(上海生工生物工程有限公司),Roche LightCycler480 PCR 定量分析仪(瑞士罗氏诊断公司);Bruker Microflex™ MALDI-TOF MS 质谱鉴定仪(德国布鲁克公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 DNA 提取:使用MALDI-TOF MS对临床分离菌株进行鉴定,分纯菌落并传代培养以获取遗传性状稳定的纯菌落。挑取血琼脂培养基上5~8个菌落加入盛有1.5 ml 去离子水的EP管中,配置菌悬液。采用Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌DNA,并将DNA液浓度标准化至20~40 ng/μl 备用。

1.3.2 PCR 扩增及 HRM 分析:所用引物参照文献<sup>[6]</sup>设计,并进行BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)序列比对以验证引物特异性<sup>[7]</sup>,引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表1。

采用含有饱和荧光染料的Roche LightCycler 480 High Resolution Melting Master PCR 扩增试剂盒(罗氏诊断公司)配制20 μl 的PCR-HRM 反应体系:Master mix 10 μl, MgCl<sub>2</sub> 2.4 μl, 三对F/R 引物各0.5 μl,模板DNA 1 μl, H<sub>2</sub>O 3.6 μl。利用

Roche Light Cyclers 480 实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)进行PCR-HRM实验,反应程序为:①预变性95℃ 1 min;②PCR反应:变性95℃ 30 s,退火55℃ 1 min,延伸72℃ 1 min,共40个循环反应;③扩增产物HRM测定:95℃ 1 min, 28℃ 1 min, 60℃~95℃升温变性,温度变化速率为0.03℃/s;④HRM分析:采用HRM基因扫描分析软件分析所有样本溶解曲线。

表1 实验所需引物序列

引物	序列	产物片段大小(bp)
V1-F	5'-GYGGCGNACGGGTGAGTAA-3'	162
V1-R	5'-TTACCCACCACTAGC-3'	
V3-F	5'-CCAGACTCTACGGGAGGCAG-3'	196
V3-R	5'-CGTATTACCGCGCTGCTG-3'	
V6-F	5'-TGGAGCATGTGGTTAATTGGA-3'	128
V6-R	5'-AGCTGACGACANCCATGCA-3'	

1.3.3 167株临床常见菌PCR-HRM分析方法的应用:通过预实验获得最佳反应条件以进行167株临床常见细菌PCR-HRM实验。将分离的167株细菌分为葡萄球菌、链球菌、非发酵阴性杆菌以及其它临床常见分离菌四组进行实验,探讨该实验方法对临床常见细菌的鉴别能力。

1.3.4 灵敏度检测:选取2株肺炎克雷伯菌DNA模板,将浓度调至20 ng/μl,采用10×倍比稀释法得到20 ng/μl~2 fg/μl的8个DNA模板浓度进行HRM实时荧光定量PCR检测。

1.3.5 PCR-HRM重复性实验:随机选取6株革兰阴性菌,一式三份,在相同条件下与阴性对照同时进行PCR-HRM检测,以此结果分析该方法的重复性。

1.3.6 常见临床感染细菌盲法验证试验:将2种临床常见标准菌株、24株临床随机分离的细菌基因组DNA浓度调至20~40 ng/μl,取DNA模板1 μl进行PCR-HRM以进行盲法验证试验。

1.3.7 测序:以MALDI-TOF MS和PCR-HRM对临床分离菌株鉴定结果进行对比,对结果不一致的细菌测序,并将测序峰图与GenBank BLAST数据库进行比对,以确定临床分离菌株的菌种。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22软件对MALDI-TOF MS和PCR-HRM两种方法进行统计分析,分型方法采用配对四格表的 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 使用MALDI-TOF MS对167株临床分离菌株进行鉴定 其中有118株评分>2分,42株质谱评分在1.8~2.0之间,7株细菌评分<1.8。对PCR-HRM和MALDI-TOF MS鉴定结果进行对

比,将结果不一致的 PCR 产物送去上海生工生物工程股份有限公司测序。以测序结果为金标准, MALDI-TOF MS 与 PCR-HRM 鉴定结果,见表 2。

表 2 MALDI-TOF MS 和 PCR-HRM 对临床分离的 167 株实验菌进行鉴定结果对比

菌种(n)	MALDI-TOF MS		PCR-HRM	
	正确鉴定	错误鉴定	正确鉴定	错误鉴定
金黄色葡萄球菌(5)	5	0	5	0
科氏葡萄球菌(8)	6	2	8	0
松鼠葡萄球菌(3)	3	0	3	0
路邓葡萄球菌(3)	3	0	3	0
腐生葡萄球菌(4)	4	0	4	0
佩藤科费尔葡萄球菌(3)	3	0	3	0
人葡萄球菌(3)	3	0	3	0
头葡萄球菌(3)	3	0	3	0
巴氏葡萄球菌(2)	2	0	2	0
停乳链球菌(5)	5	0	5	0
星座链球菌(2)	2	0	2	0
无乳链球菌(3)	3	0	3	0
口腔链球菌(3)	3	0	3	0
缓症链球菌(4)	4	0	4	0
戈登链球菌(4)	4	0	4	0
化脓链球菌(4)	4	0	4	0
解链食子酸链球菌(2)	2	0	2	0
咽峡炎链球菌(4)	4	0	4	0
血液链球菌(3)	3	0	3	0
肺炎链球菌(2)	2	0	2	0
中间链球菌(2)	2	0	2	0
铜绿假单胞菌(3)	3	0	3	0
荧光假单胞菌(4)	4	0	4	0
恶臭假单胞菌(4)	4	0	3	1
栖居黄色单胞菌(2)	2	0	2	0
腐败希瓦菌(2)	2	0	2	0
木糖氧化物种杆菌(6)	6	0	6	0
粪产碱杆菌(2)	2	0	2	0
鲍曼不动杆菌(3)	3	0	3	0
奥斯陆莫拉菌(4)	4	0	3	1
卡他莫拉菌(2)	2	0	2	0
食酸代未特菌(1)	1	0	1	0
克氏特从毛单胞菌(1)	1	0	1	0
翠九刚丛毛单胞菌(1)	1	0	1	0
产明味金黄色杆菌(8)	7	1	8	0
少动鞘氨醇单胞菌(1)	1	0	1	0
黏液玫瑰单胞菌(1)	1	0	1	0
脑膜炎伊丽莎白菌(2)	2	0	2	0
产气荚膜梭菌(2)	2	0	2	0
肺炎克雷伯菌(3)	3	0	3	0
大肠埃希菌(3)	3	0	2	1
福氏志贺菌(3)	1	2	3	0
产气肠杆菌(5)	5	0	5	0
阴沟肠杆菌(3)	3	0	3	0
棉子糖肠球菌(2)	2	0	2	0
鸢尾肠球菌(3)	3	0	3	0
海氏肠球菌(4)	4	0	4	0
缺陷乏养菌(2)	2	0	2	0
非发酵棒状杆菌(8)	8	0	8	0
脓肿分枝杆菌(4)	4	0	4	0
痤疮丙酸杆菌(3)	3	0	3	0
小韦氏球菌(1)	1	0	1	0
脑膜炎奈瑟菌(1)	1	0	1	0
淋病奈瑟菌(1)	1	0	1	0
总计(54种 167株)	162(97.0%)	5(3.0%)	164(98.2%)	3(1.8%)

注:1. PCR-HRM 鉴定正确:多菌株同类聚为区别于其它菌种的一类;单独一株有区别于其它菌株,尤其是革兰染色相同或种属相近菌株的单独特征曲线。PCR-HRM 鉴定错误:未和已知(测序确定,或标准菌株,或同种菌株中的多数)聚为同类。2. 采用 SPSS 22 软件计算后显示 PCR-HRM 与 MALDI-TOF MS 鉴定结果差异无统计学意义( $\chi^2=1.97, P=0.727>0.05$ )。

实验结果显示该实验方法可区分金黄色葡萄球菌及凝固酶阴性葡萄球菌,甚至可将凝固酶阴性葡萄球菌区分到种级,见图 1。对于链球菌、非发酵阴性杆菌以及其它常见临床分离菌,PCR-HRM 方法可将细菌区分至属级,并且大部分临床感染菌可区分至种级。

2.2 灵敏度检测 采用  $10\times$  倍比稀释法得到  $20\text{ ng}/\mu\text{l}\sim 2\text{ fg}/\mu\text{l}$  的 8 个 DNA 模板浓度,进行 PCR-HRM 分析测定其灵敏度。图 3 所示,DNA 模板浓度在  $20\text{ ng}/\mu\text{l}\sim 2\text{ pg}/\mu\text{l}$  范围可获得特征性溶解曲线, $200\text{ fg}/\mu\text{l}\sim 2\text{ fg}/\mu\text{l}$  浓度与阴性对照结果聚类,结果显示该实验方法可检测到  $2\text{ pg}/\mu\text{l}$  浓度的 DNA 模板。

2.3 重复性实验 随机选取 6 株革兰阴性菌,一式三份,在相同条件下与阴性对照同时进行 PCR-HRM 检测。6 株实验菌 3 份的重复性结果完全一致,见图 4,证明该实验重复性良好。

2.4 常见临床感染细菌盲法验证试验 见图 5。常见临床感染细菌 PCR-HRM 盲法验证试验结果显示,24 株临床分离感染细菌与 2 株标准菌株均产生特征性溶解曲线。根据标准菌株产生的扩增曲线,可成功鉴别出 5 株金黄色葡萄球菌和 3 株大肠埃希菌。其它 16 株细菌均经 MALDI-TOF MS 鉴定,分别为 5 株鲍曼不动杆菌、3 株人葡萄球菌、3 株屎肠球菌、3 株黏质沙雷菌、2 株洋葱伯克霍尔德菌,评分均  $>1.8$ ,PCR-HRM 盲法验证试验结果与 MALDI-TOF MS 鉴定结果一致。

3 讨论 人体常见致病菌种类繁多,如葡萄球菌、链球菌、大肠埃希菌与变形杆菌等,许多临床常见病原菌以其能够产生广泛的耐药性而闻名,其中最常见的是“ESKAPE”病原菌(肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌属)<sup>[8]</sup>。虽然常见致病菌感染后的临床表现相似,但最佳的治疗方案取决于致病菌的种类。通常,用于经验性治疗可疑细菌感染的第三代头孢菌素和呋喃唑酮类药物对铜绿假单胞菌感染没有作用;鲍曼不动杆菌对头孢菌素和氨基糖苷类抗生素耐药;大肠埃希菌和克雷伯氏菌等肠杆菌有着广泛的耐药基因,需要进一步检测以确定其药敏。因此,病原菌种类的鉴定可引起治疗方案的变化,对科学指导患者进行个体化抗生素治疗有着重要意义<sup>[9-10]</sup>。

在我国临床诊断实验室中,菌种鉴定通常基于传统培养技术,这种方法可能需要  $8\sim 120\text{ h}$ 。然后经革兰染色显微镜观察,将分离出的病原菌分为革兰阴性或革兰阳性两种,并利用选择性培养基和生化试验进一步鉴定。二次培养步骤通常需要  $8\sim$

48 h, 利用生化鉴定板(如 API20E 肠道菌试剂鉴定条)鉴定需要 24 h 的孵育<sup>[11]</sup>。

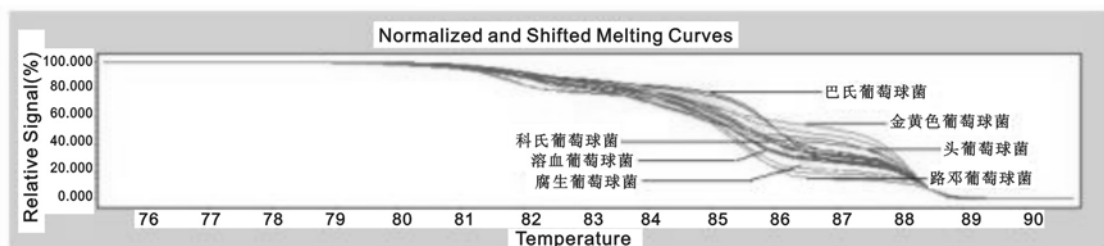


图1 临床常见葡萄球菌溶解曲线图

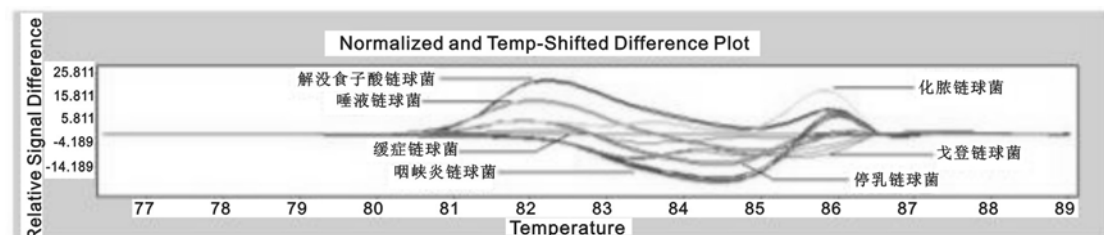


图2 临床常见链球菌溶解曲线图

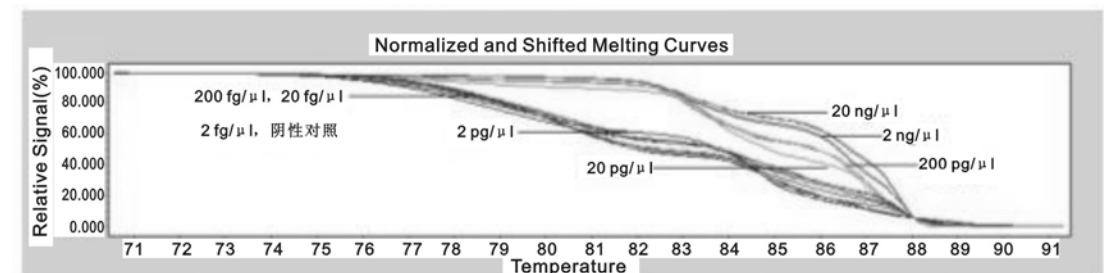


图3 PCR-HRM 灵敏度检测结果

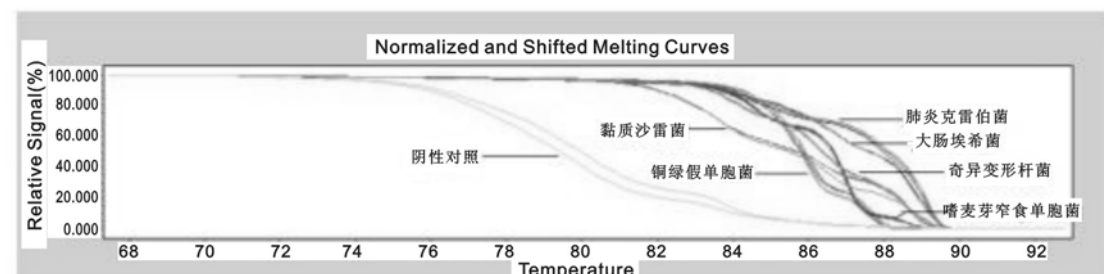


图4 PCR-HRM 重复性试验溶解曲线结果

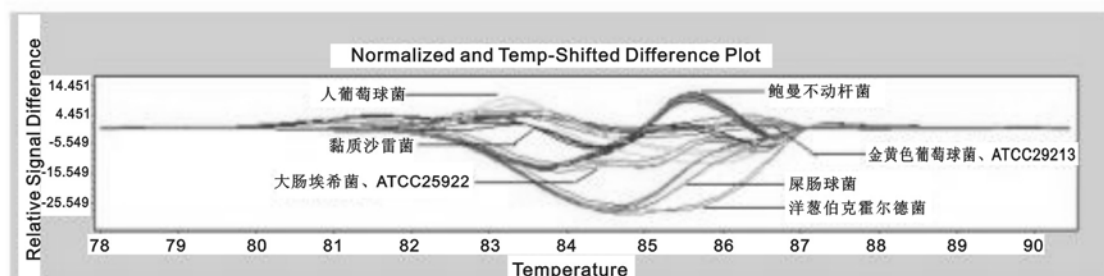


图5 临床分离24株感染细菌与2株标准菌株的盲法验证曲线图

近年来,分子检测技术已用于细菌种类的鉴定,这种方法提供的结果比传统鉴定更快速。已有研究表明快速分子检测的运用缩短了最佳治疗时间和病原菌感染者的出院时间。16S rRNA 序列测定可用于细菌鉴定,但成本高、耗时长、临床应用有限<sup>[12]</sup>。其它可提供高度复用性的细菌检测方法,如 FilmArray 血培养鉴定组合(Biofre Diagnost-

ics,美国)和 Verigene 革兰阴性血培养分析(Nansphere,美国)可以在样本初始培养阳性后 2 h 内提供结果,但这些检测方法不仅费用昂贵,还需要专门的仪器检测。

本研究的目的是建立一种基于 HRM 分析鉴别临床常见感染细菌的检测方法,通过使用 3 对细菌高覆盖度的 16S rRNA 引物构造多重差异曲线

对细菌进行分类,为培养初期病原菌的快速鉴定提供依据<sup>[13]</sup>。在PCR反应后,反应以0.1℃递增加热,荧光信号则由实时PCR系统监测。扩增产物在熔解温度下进行解离释放饱和染料,导致荧光信号改变,通过捕获荧光信号产生特征性荧光曲线,对临床常见病原菌进行鉴别。PCR-HRM分析可提供一种快速、简单、低成本、封闭的扩增分析方法,具有单核苷酸识别能力<sup>[14]</sup>,并且有较高的灵敏度、特异度与可重复性<sup>[15]</sup>。这种方法大大降低了临床常见病原菌对DNA测序的需求与鉴定成本。

该分子诊断方法存在的一个局限性是无法通过标准曲线对细菌进行量化。由于饱和染料的非特异性,任何扩增产物都能产生荧光,多个目标可能同时被放大,使定量不可靠。这种方法的另一个缺点是,扩增区域内具有相同序列的、亲缘关系密切的菌种不容易被区分,所以应用这项技术进行亲缘关系较近的细菌鉴定时应设计特异度较强的引物。预测这项鉴定方法将成为鉴别临床常见感染菌有用的诊断工具,它不仅可快速检测实验结果,其成本与传统检测方法相比也更低。但这种鉴定方法的推广需要进行更多样本的验证,以便更准确地确定其性能。此外,该方法可指导临床个体化用药治疗,我们可以进行一项实验研究,以衡量快速检测病原菌在抗生素个体化治疗方面的临床意义。

综上所述,该方法通过使用3对16S rRNA引物构造多重HRM曲线可对临床常见细菌进行分类到属级甚至种级,且灵敏度高、特异度强,可以作为鉴定临床常见感染菌的新选择。

#### 参考文献:

- [1] SOUZA R A, FRAZAO M R, ALMEIDA A M, et al. Rapid and efficient differentiation of *Yersinia* species using high-resolution melting analysis[J]. J Microbiol Methods, 2015, 115(8): 6-12.
- [2] 郑昭璟, 傅启华, Zhou Luming. 高分辨熔解曲线分析技术的发展与展望[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(2), 77-79.  
ZHENG Zhaojing, FU Qihua, ZHOU Luming. The development and prospects of high-resolution melting analysis[J]. Chin J Lab Med, 2017, 40(2), 77-79.
- [3] YANG S, RAMACHANDRAN P, ROTHMAN R, et al. Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2252-2255.
- [4] LUCIE N, DANA S, VLADISLAV R. Usefulness of PCR-HRM in identification of non-fermentative Gram-negative rods recovered from patients suffering from cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease[J]. Folia Microbiologica, 2014, 59(6): 17-21.
- [5] 周爱萍, 吴文娟. 高分辨熔解曲线分析在临床细菌鉴定及药敏检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(2): 84-87.
- [6] ZHOU Aiping, WU Wenjuan. Clinical application of high resolution melting curve assay in bacteria identification and antimicrobial susceptibility testing[J]. Chin J Lab Med, 2017, 40(2): 84-87.
- [7] CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria[J]. J Microbiol Methods, 2007, 69(2): 330-339.
- [8] 张孟, 李倩, 周华君, 等. 巢氏PCR扩增低拷贝HBV全基因组方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 44-49.
- [9] ZHANG Meng, LI Qian, ZHOU Hua-jun, et al. Establishment and application of nested PCR amplification method for the whole genome of HBV with the low copy[J]. J Mod Lab Med, 2018, 33(3): 44-49.
- [10] EI HADDAD L, HARB C P, GEBARA M A, et al. A systematic and critical review of bacteriophage therapy against multi-drug resistant ESKAPE organisms in humans[J]. Clin Infect Dis, 2018, 11(3), 1063-1093.
- [11] EDWARDS T, SASAKI S, WILLIAMS C, et al. Speciation of common gram-negative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10-18.
- [12] TIWARI V. Post-translational modification of ESKAPE pathogens as a potential target in drug discovery[J]. Drug Discov Today, 2019, 24(3): 12-17.
- [13] BORK J T, LEEKHA S, HEIL E L, et al. Rapid testing using the verigene gram-negative blood culture nucleic acid test in combination with antimicrobial stewardship intervention against gram-negative bacteremia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(3): 1588-1595.
- [14] EVERMAN S, WANG S Y. Rapid differentiation of bacterial communities using high resolution melting analysis[J]. J Microbiol Methods, 2017, 140(9): 72-81.
- [15] OZBAK H, DARK P, MADDI S, et al. Combined molecular gram typing and high-resolution melting analysis for rapid identification of a syndromic panel of bacteria responsible for sepsis-associated bloodstream infection[J]. J Mol Diagn, 2012, 14(7): 176-184.
- [16] REN Xingxing, FU Ying, XU Chenggang, et al. High resolution melting (HRM) analysis as a new tool for rapid identification of salmonella enterica serovar gallinarum biovars pullorum and gallinarum[J]. Poult Sci, 2017, 96(5): 1088-1093.
- [17] 梁雪妮, 崔步云, 毛玲玲, 等. PCR-HRM方法快速鉴定布鲁氏菌的初步应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 255-259.
- [18] LIANG Xue-ni, CUI Bu-yun, MAO Lingling, et al. Clinical application of PCR and high resolution melting analysis for rapid identification of *Brucella* isolates[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(3): 255-259.

收稿日期: 2019-01-20

修回日期: 2019-04-07