

实时荧光定量 PCR 法检测中药制剂中沙门菌

刘卫德, 张文婷, 易巧, 熊骏, 刘绪平* (江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

摘要: 目的 采用实时荧光定量 PCR 技术, 建立一种中药制剂中沙门菌的快速检测方法。方法 将中药制剂加入适量的胰酪大豆胨液体培养基中进行增菌后, 取增菌液以热裂解法提取总 DNA, 采用实时荧光定量 PCR 法特异性检测沙门菌。结果 建立了中药制剂中沙门菌的实时荧光定量 PCR 检测法, 检测可在 24 h 内完成, 灵敏度达每 10 g(10 mL) 供试品 1 cfu, 特异性为 100%, 采用该方法检测 18 批次样品结果与药典方法一致。结论 采用实时荧光定量 PCR 法可明显缩短中药制剂中沙门菌检测周期, 具有良好的灵敏度和特异性, 可作为药典检测方法的有效补充。

关键词: 中药制剂; 沙门氏菌; 实时荧光定量 PCR; 快速检测

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)07-0836-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.011

引用本文: 刘卫德, 张文婷, 易巧, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测中药制剂中沙门菌[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 836-840.

Detection of *Salmonella* in Traditional Chinese Medicine Preparations by Real-time Fluorescence Quantitative PCR

LIU Weide, ZHANG Wenting, YI Qiao, XIONG Jun, LIU Xuping* (Jiangxi Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid detect method for *Salmonella* in traditional Chinese medicine by real-time fluorescence quantitative PCR. **METHODS** Adding the traditional Chinese medicine to an appropriate amount of trypticase soy broth medium for bacteria enrichment, and the total bacterial DNA in the enrichment fluid was extracted by boiling method, then the real-time fluorescence quantitative PCR method was used to specifically detect the *Salmonella* in the sample. **RESULTS** A real-time fluorescence quantitative PCR assay for the detection of *Salmonella* in traditional Chinese medicine was established. The detection could be completed within 24 h, sensitivity was up to per 10 g(10 mL) samples 1 cfu, and the specificity was 100%. 18 batches of samples were detected by this method and the results were identical with detected by the method described in Chinese Pharmacopoeia. **CONCLUSION** For Real-time fluorescence quantitative PCR method, the detection time of *Salmonella* in traditional Chinese medicine preparations can significantly shorten and with good sensitivity and specificity, which can be an effective supplement of the test method included in Chinese Pharmacopoeia.

KEYWORDS: traditional Chinese medicine preparations; *Salmonella*; real-time fluorescence quantitative PCR; rapid analysis

沙门氏菌(*Salmonella*)是常见的一类具有高度传染性且危害严重的革兰氏阴性杆菌, 其致病因素包括侵袭力、肠毒素和内毒素 3 种, 临床上可引起肠热症、胃肠炎、菌血症或败血症等^[1-2]。因其在自然界中广泛分布, 并可在动植物体定殖, 且在粪便、土壤、食品、水中可生存 5 个月至 2 年之久, 而中药制剂绝大部分都是由动植物加工炮制而成, 且大量丸散膏丹的处方中常有原粉入药, 因此, 监测中药制剂中的沙门菌是评价药品质量的重要指标。中国药典 2015 年版四部通则

“1107 非无菌药品微生物限度标准”中明确规定, 对含药材原粉的中药口服制剂及含脏器提取物的口服制剂均要求不得检出沙门菌(10 g 或 10 mL)。同时, 中国药典 2015 年版四部通则“1106”中亦给出了沙门菌的检查方法, 采用该方法进行检查, 需要将培养物依次接种至 4 种不同的培养基中, 操作复杂且时间周期较长, 仅培养阶段就需要 72~120 h^[3], 而中国药典 2020 年版中沙门菌检查法也与 2015 年版一致^[4]。另外, 沙门菌的检出还可能受到多种外界因素干扰, 如药品在生产过程

基金项目: 江西省食品药品监督管理局科研项目(2017YX05); 江西省重点研发计划项目(20192BBGL70052); 江西省药品监督管理局科研项目(2019JS30)

作者简介: 刘卫德, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0791)88158796 E-mail: liuweide84@126.com *通信作者: 刘绪平, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0791)88158796 E-mail: sanyezao@yeah.net

中,经常受到加热、干燥等加工步骤的影响,所污染的沙门菌可能受到损伤或呈休眠状态,导致不易检出^[2];药品及防腐剂也可能会抑制沙门菌的繁殖,导致不易检出;此外,多次转移接种操作还易引入外源性污染,影响检验结果的准确性。

实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR)是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。它具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、自动化程度高、全封闭反应等优点,成为分子生物学研究中的重要工具^[5-7]。目前该技术已在临床疾病诊断及疗效评价、动物疾病检测、食品安全及生命科学研究等领域广泛应用^[8-12],但在中药制剂沙门菌检测中的应用尚鲜见报道。本研究旨在建立一种中药制剂中沙门菌的 RT-PCR 检测方法,并对方法的可行性进行评估,为实现药品中沙门菌的快速检测提供参考。

1 材料

1.1 实验用菌

本研究共使用沙门菌 19 株,非沙门菌 43 株,其中乙型副伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌、短小芽孢杆菌各 1 株购自中国医学细菌保藏管理中心,甲型副伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、肠沙门氏菌肠亚种、鼠伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌孔成道夫变种、鸭沙门氏菌、汤卜逊沙门氏菌、肠炎沙门氏菌肠亚种婴儿血清型、病牛沙门氏菌、单增李斯特菌、莱士曼乳杆菌、黏质沙雷菌、副溶血性弧菌、坂崎肠杆菌、干酪乳杆菌各 1 株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,其他包括 3 株未分型沙门氏菌、2 株猪霍乱沙门氏菌以及鼠伤寒沙门氏菌、林登堡沙门氏菌、阿贡纳沙门氏菌、溶血性葡萄球菌、巴氏葡萄球菌、头状葡萄球菌、科氏葡萄球菌、表皮葡萄球菌、黄杆菌、谷氨酸杆菌、赖氨酸杆菌、乙酸钙不动杆菌、气囊栖水菌、支气管戈登菌、少动鞘氨醇单胞菌、泡囊短波单胞菌、环状芽孢杆菌、尼氏芽孢杆菌、京吉山芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、阿耶波多氏芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、嗜根考克氏菌、贪铜菌、非发酵棒状杆菌、罗斯氏菌、皮生球菌、滕黄微球菌、云南微球菌、

成团泛菌、奥斯陆莫拉菌、肺炎克雷伯菌、栖稻假单胞菌、荧光假单胞菌各 1 株为江西省药品检验检测研究院抗生素室分离保藏菌株。

1.2 培养基与试剂

胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基(tryptose soya agar, TSA)均购自北京陆桥技术股份有限公司;Es Taq DNA Polymerase(每微升 5 U,批号:10112)购自康为世纪生物科技有限公司。

1.3 引物探针

根据文献调研,并采用 NCBI 网站 Primer-BLAST 软件在线分析后,确定采用的引物与探针序列如下:上游引物(5'GCTATTTTCGTCCGGCA TGA3');下游引物(5'GCGACTATCAGGTTACCGT GGA3');探针(FAM-TAGCCAGCGAGGTGAAAA CGACAAAGG-BHQ1),引物探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 仪器

CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),5424R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Spectra Max Quick Drop 超微量可见紫外分光光度计(Molecular Devices),SPL-250 生化培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 菌液制备与 DNA 提取

2.1.1 菌液制备 供试品溶液:取中药制剂(液体制剂 10 mL,固体制剂 10 g)置无菌锥形瓶中,加入 TSB 至 200 mL;供试品阳性对照菌液:上述供试液中加入 1 mL 沙门菌菌液(100 cfu·mL⁻¹);阳性对照菌液:无菌锥形瓶中加入 TSB 至 200 mL,再加入 1 mL 沙门菌菌液(100 cfu·mL⁻¹);以 TSB 培养基作为阴性对照。上述溶液分别置于 36 °C 恒温培养箱中过夜培养(约 16 h)后,作为试验菌液,用于后续 DNA 提取。

2.1.2 DNA 提取 采用热裂解法提取沙门菌 DNA,分别取上述增菌液 1 mL,置 1.5 mL 无菌离心管中,1 000 r·min⁻¹ 离心 30 s,上清液转移至另一 1.5 mL 无菌离心管中,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃上清,菌体沉淀以 200 μL 无菌水重悬,于 95 °C 水浴锅加热 10 min,再以 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液作为 PCR 反应模板 DNA 溶液。

2.2 荧光定量 PCR 检测

PCR 反应体系: 模板 2 μL 、Taq 酶(5 U· μL^{-1}) 0.2 μL 、PCR 缓冲液(含 Mg^{2+} 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 5 μL 、dNTPs(各 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1 μL 、探针(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、ddH₂O 补足至 25 μL 。

PCR 检测条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 并收集荧光, 40 次循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 检测线性范围

取乙型副伤寒沙门氏菌阳性对照菌液 2 mL, 按“2.1”项下 DNA 提取法提取 DNA 后, 以超微量紫外可见分光光度计检测核酸浓度及质量。并以该 DNA 溶液为母液, 用无菌水进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 9 个梯度。取上述 DNA 溶液各 2 μL , 每个浓度 2 个平行重复, 按“2.2”项下方法检测。分析检测结果, 并以循环阈值(cycle threshold value, CT)值为纵坐标, DNA 浓度对数值为横坐标进行线性回归分析, 评估方法检测线性范围。

2.4 方法特异性

“1.1”项下 19 株沙门菌及 43 株非沙门菌分别接种至 200 mL 的 TSB 中, 置于 36 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 按“2.1”项下 DNA 提取法提取 DNA 后, 按“2.2”项下方法进行检测, 分析方法的检测特异性。

2.5 检测灵敏度

取过夜培养的乙型副伤寒沙门氏菌菌液 1 mL, 以无菌生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 共稀释 10 个浓度, 各稀释级分别取 1 mL 涂布 2 个 TSA 平板(每

皿 0.5 mL), 置于 36 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 点计各平板菌落数, 计算菌液浓度。同时将原液及各稀释级菌液 1 mL 分别接种至 200 mL TSB 培养基中, 分别置于 36 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中过夜培养(16 h), 按“2.1”项下方法提取 DNA 后, 按“2.2”项下方法进行检测, 评估方法检测灵敏度。

2.6 实际应用

以 18 批(含片剂 6 批, 口服液 5 批, 丸剂 3 批, 胶囊剂 3 批, 散剂 1 批, 见表 1)按中国药典 2015 年版规定需进行沙门菌检验的中药制剂为研究对象, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别按“2.1~2.2”项下方法及中国药典 2015 年版四部“1106”中的方法同时进行检查, 评估方法的实际应用效果。

3 结果

3.1 检测方法的确立

以乙型副伤寒沙门氏菌为阳性菌, 采用本研究建立的菌液制备方法及 DNA 提取方法, 供试品阳性对照菌液及阳性对照菌液中均能有效的提取到沙门菌 DNA, 并可用于后续的 PCR 检测。通过调整退火温度及反应体系中相应组分的加入量, 最终确定了“2.2”项下反应体系与条件, 采用该体系与条件, 以定性 PCR 的方法扩增后, 通过凝胶电泳分析, 在目的大小位置(约 260 bp)处有特异性扩增条带, 经测序比对分析证实为沙门菌基因序列。采用“2.2”项下方法, 以乙型副伤寒沙门氏菌基因组为模板进行荧光定量 PCR 检测, 结果为典型的 S 形荧光增长曲线, 说明本研究采用的引物探针能够用于沙门菌的检测分析。

表 1 2 种方法检测 18 批中药制剂结果比较

Tab. 1 Results comparison of 18 batches of traditional Chinese medicine detected by two different methods

药品名称	批数	批号	供试品		供试品阳性对照	
			RT-PCR 法	药典方法	RT-PCR 法	药典方法
健胃消食片	5	19012001, 18012004, 19011002, 20170905, 181105	-	-	+	+
金果含片	1	180601	-	-	+	+
牛黄蛇胆川贝液	4	180512, 181105, 181123, 181120	-	-	+	+
三蛇胆川贝液	1	180101	-	-	+	+
女金胶囊	2	1708080, 1803018	-	-	+	+
金水宝胶囊	1	180122	-	-	+	+
乌鸡白凤丸	2	171201, 180804	-	-	+	+
大活络丸	1	180801	-	-	+	+
四逆散	1	20180402	-	-	+	+

注: “-”表示未检出沙门菌; “+”表示检出沙门菌。

Note: “-” indicated that *Salmonella* was not detected; “+” indicated that *Salmonella* was detected.

3.2 检测线性范围

阳性对照菌液提取 DNA 后,以超微量紫外可见分光光度计检测得到核酸浓度为 $1\ 526\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $A_{260}/280$ 比值为 2.096。以该 DNA 溶液 10 倍梯度稀释后进行 RT-PCR 检测的结果见图 1,各稀释级的平均 CT 值为原液(13.12)、 10^{-1} (16.24)、 10^{-2} (19.635)、 10^{-3} (23.095)、 10^{-4} (26.41)、 10^{-5} (29.645)、 10^{-6} (32.675), 10^{-7} (35.47 只有一个平行有特异性扩增)。以 CT 值为纵坐标,核酸浓度对数值为横坐标进行线性回归,分析的结果见图 1。

该检测方法能够准确检测到 10^{-6} 稀释级,即 $1.5\times 10^{-3}\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DNA 溶液,且各稀释级平行处理间的标准偏差 $<1.31\%$,说明该方法具有很低的检测限及较好的重复性。PCR 反应的扩增效率为 101.1%,CT 值与核酸浓度对数值间的线性回归相关系数 R^2 为 1.0,说明采用该方法能够准确检测 DNA 浓度在 $1.5\times 10^{-3}\sim 1.5\times 10^3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内的样品,且在该浓度范围内核酸浓度对数值与 CT 值呈线性相关。结果见图 1。

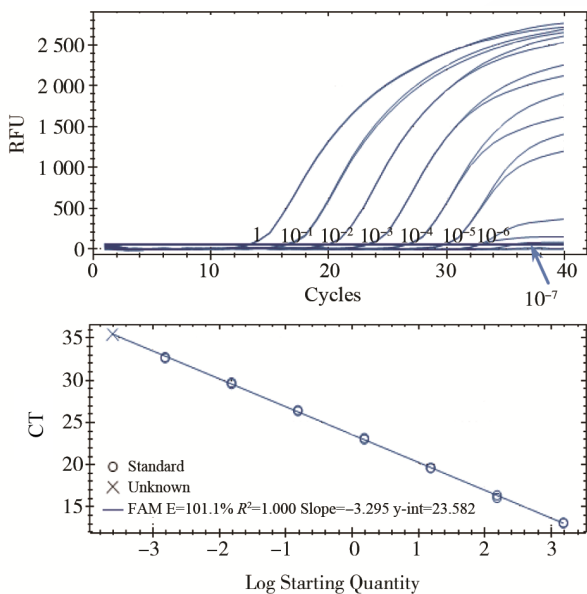


图 1 沙门氏菌 DNA 溶液 10 倍梯度稀释检测结果
Fig. 1 Test results of 10 times gradient dilution of *Salmonella* DNA solution

3.3 方法特异性

19 株沙门菌及 43 株非沙门菌的检测结果见图 2,可见 19 株沙门菌均有典型的 S 形荧光增长曲线,且 CT 值均 <22 ,而 43 株非沙门菌均无荧光增长曲线,说明本方法采用的引物探针能够有针对性的检测出沙门菌而不受其他细菌基因的干扰,特异性为 100%。

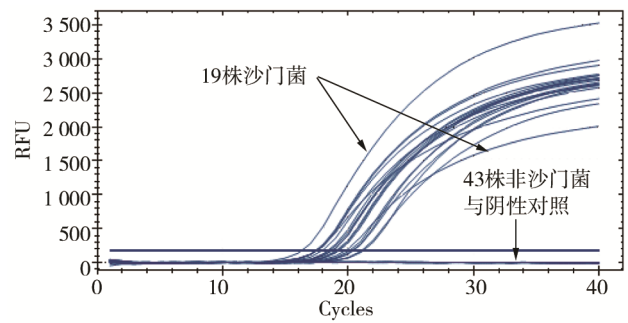


图 2 特异性检测结果
Fig. 2 Specificity test results

3.4 检测灵敏度

通过平板计数得到过夜培养菌液浓度为 $4.6\times 10^9\ \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取各稀释级过夜培养的菌液,提取 DNA 检测发现,所有稀释级(包括第 10 个稀释级,浓度为 $4.6\times 10^{-1}\ \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)都有扩增,且 CT 值均 <20 ,说明该方法理论上能够检测到样品中沙门菌的限度为 0.46 cfu(或单个 cfu),即在供试品检验时,10 g 或 10 mL 样品中只要含 1 cfu 的沙门菌采用该方法即可被检测出来,因此,具有很高的检测灵敏度。同时也说明以 TSB 为培养基,于 $36\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养过夜(16 h)的增菌条件,足以满足后续的检测需要。

3.5 实际应用

18 批中药制剂的 RT-PCR 检测结果见图 3,阳性对照菌液及所有 18 批供试品阳性对照菌液均有典型的 S 形荧光增长曲线,说明 18 批样品均对乙型副伤寒沙门菌的生长无抑制作用;同时所有供试品溶液及阴性对照均无荧光增长曲线,说明 18 批样品均无沙门菌污染。这些检测结果均与按药典方法检测的结果一致(表 1),说明本研究建立的方法能够满足中药制剂中沙门菌检测的需要,可作为药典方法的有效补充。

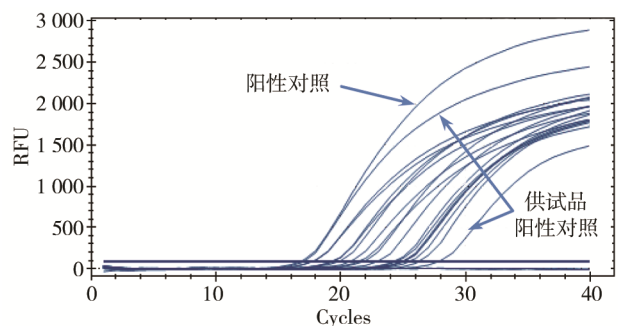


图 3 18 批中药制剂检测结果
Fig. 3 Test results of 18 batches of traditional Chinese medicine

4 讨论

中国药典 2015 年版中采用细菌培养检查法检查沙门菌, 2020 年版药典四部通则中虽增加了分子生物学检查法, 但主要是针对中药等的种属鉴定及细菌鉴定, 并不涉及控制菌的检查^[4], 而中药制剂中沙门菌的 PCR 检测方法目前尚鲜见报道^[2,13]。本研究采用一次增菌, 热裂解法提取 DNA 后, 以 RT-PCR 法检测中药制剂中的沙门氏菌, 检测最快能在 18 h 内完成, 以乙型副伤寒沙门氏菌 DNA 溶液为模板的检测线性范围为 $1.5 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 能够特异性的检测沙门菌, 且灵敏度达每 10 g 或每 10 mL 供试品 1 cfu, 采用该方法检测 18 批中药制剂结果与中国药典方法一致。非无菌药品微生物限度标准中对沙门菌的限度要求为不得检出(10 g 或 10 mL)^[3], 因此检测方法的灵敏度必须达到单个 cfu, 本研究建立的方法能够满足这一要求, 且具有更短的检测周期等优点, 可作为药典的方法的有效补充, 用于中药制剂中沙门菌的快速检测。

中药制剂组方复杂, 成分繁多, 很多成分可能会对沙门菌的生长有抑制作用^[14-15]。因此, 与药典检测方法一样, 阳性与阴性对照的设置对控制检测结果的质量十分重要, 为避免出现假阴性结果, 需同时设置阳性对照与供试品阳性对照。一旦出现阳性对照结果为阳性, 而供试品阳性对照结果为阴性的情况, 得到的结果很可能就是假阴性, 表明该制剂可能会抑制沙门菌的增殖, 出现这种情况应进行方法学验证, 必要时可采用薄膜过滤法冲洗等消除制剂对沙门菌的生长抑制作用后, 再进行增菌检测。本研究目前检测了 18 批中药制剂, 均未发现药物对沙门菌生长的明显抑制作用, 后续还需增加样本量, 评估方法的普遍适用性。另外, 在检测中增加内参对照, 也可以避免检测过程中出现假阴性的情况^[16]。

本研究建立了一种中药制剂中沙门菌的 RT-PCR 检测方法, 采用特异性的引物探针, 可特异的检测出样品中是否污染沙门菌, 不受样品中其他微生物及抑菌成分的干扰, 从而省去纯培养步骤; 同时, 利用 RT-PCR 技术的高灵敏度、自动化程度高、反应快速等特点, 样本进行过夜增菌后便可用于检测, 将检测周期缩短至 24 h 以内; 此外, 由于减少了传代步骤且 PCR 反应在封闭体系中进行, 还不易与外界产生交叉污染。因此, 建立中药制剂沙门菌 RT-PCR 检查法, 可以克服传统细菌培

养检查法中存在的诸多弊端, 作为一种快检方法, 节约药品微生物检验中的时间及劳动力成本, 同时, 该方法经适当调整后还可用于中药饮片、食品等领域沙门菌的检测。

REFERENCES

- [1] CHEN J H, OU J M, YANG J S, et al. Analysis on the distribution of serotypes and drug resistance with *Salmonella* Strains, Fujian province, 2006-2011[J]. Prev Med Tribune(预防医学论坛), 2014, 20(2): 81-83, 87.
- [2] BU Y, WU H P, ZHANG X Y, et al. Rapid detection of *Salmonella* in drugs by Polymerase chain reaction[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2015, 15(14): 2645-2648.
- [3] 中国药典. 四部[S]. 2015: 145.
- [4] 中国药典. 四部[S]. 2020: 167-168.
- [5] KUBISTA M, ANDRADE J M, BENGTSSON M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(2/3): 95-125.
- [6] 赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007(16): 492-497.
- [7] LIU X R, ZHANG L, WANG Y P. Theory study and medical application of real-time quantitative polymerase chain reaction [J]. J Clin Rehabilitative Tissue Eng Res(中国组织工程研究与临床康复), 2010, 14(2): 329-332.
- [8] GAO Z Q, XING J, FENG Y F, et al. TaqMan MGB probe real-time fluorescence quantitative PCR for rapid detection of *Mycoplasma*[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(9): 1770-1775.
- [9] HAN Y S, HUANG H Z, MENG P, et al. The effect of Xiaoyao Kangai Jieyu Formula on expression of NMDAR related protein in hippocampus of mice with breast cancer related with depression[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(5): 628-634.
- [10] CRAMPTON B G, PLUMMER S J, KACZMAREK M, et al. A multiplex real-time PCR assay enables simultaneous rapid detection and quantification of bacteria associated with acute oak decline[J]. Plant Pathol, 2020, 69(7): 1301-1310.
- [11] YANG Y, LI L, WANG H, et al. Development and verification of a quantitative real-time PCR method to identify and quantify gelatin derived from animal hide[J]. J Food Sci, 2020, 85(9): 2762-2772.
- [12] LI Y, CHEN J, JIANG J X, et al. Detection of residual DNA of *Pichia pastoris* in ornithine aspartate by real-time PCR[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(8): 1158-1161.
- [13] LIU T T, WANG L H, WANG Z W, et al. Application of fluorescence quantitative PCR in *Salmonella* rapid detection in drugs[J]. China Pharm(中国药师), 2014, 17(2): 242-244.
- [14] LIU Y, LI S H, LI H S, et al. Antibacterial effects of 12 kinds of traditional Chinese medicine on *Salmonella in vitro*[J]. J Tradit Chin Vet Med(中兽医医药杂志), 2020, 39(1): 17-19.
- [15] LI D, YU D, ZENG F L, et al. Combined antibacterial effect of five traditional medicines against *Salmonella choleraesuis*[J]. Chin J Vet Sci(中国兽医学报), 2019, 39(2): 318-322.
- [16] KASTURI K N. A real-time PCR for rapid identification of *Salmonella enterica* Gaminara serovar[J]. J Microbiol Methods, 2020(169): 105729. Doi: 10.1016/j.mimet.2019.105729.

收稿日期: 2020-05-11

(本文责编: 蔡珊珊)