

# 食源性单核细胞增生李斯特菌CRISPR结构的研究

狄慧玲<sup>1</sup>, 闫鹤<sup>1,2</sup>, 石磊<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013)

**摘要:** 为探明河北省 2177 份零售食品样本中检出的 18 株谱系 I (血清型 1/2b, 4b) 菌株的 CRISPR 序列结构, 用 PCR 方法扩增了其 CRISPR 序列, 采用生物信息学方法进行序列同源性分析, 并根据在 18 菌株中 CRISPR 结构的阵列排布进行聚类分型研究。结果表明: 18 株菌共检出三类 CRISPR 序列排布 (CRISPR array: locus1, 2, 3)。CRISPR locus1 是一退化残基, repeat 序列保守性差, spacer 数量少。locus2 和 locus3 是新掺入的, 结构完整, 活力旺盛, repeats 序列保守, spacer 数量增长迅速。locus1 最普遍 (13/18); 有 5 株 serotype 1/2b 的菌株检出至少两个活性 loci (locus2 和 locus3) 中的一个, 在 serotype 4b 菌株中未检出。总计, 基因组中具有 3 个 CRISPR loci 的有 2 株, 具有 2 个的有 3 株, 仅有 1 个的有 8 株, 无该结构的有 5 株。根据 CRISPR array 的排布共将 18 株菌聚类分型为 5 簇, 4 个亚簇, 能较好的对 1/2b 血清型的菌株进行分型研究。该免疫防御系统的插入, 增强了高致病性谱系 I 菌株对环境的适应能力, 增大了消除食品加工销售过程中该类菌株的难度, 给食品安全造成更大威胁, 因此相关部门应加强对该特征菌株的监管力度。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特菌; 规律成簇的串联重复序列; 谱系; 血清型

文章编号: 1673-9078(2014)8-64-69

## Analysis of CRISPR Regions in Food-borne *Listeria monocytogenes*

DI Hui-ling<sup>1</sup>, YAN He<sup>1,2</sup>, SHI Lei<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

**Abstract:** In order to find out CRISPRs in 18 lineage I (serotype 1/2b, 4b) strains of food-borne *Listeria monocytogenes* isolated from 2177 retail food samples in Hebei province, the CRISPR sequences were obtained by PCR amplification, and homology analysis was predicted using bioinformatic methods, then cluster typed by using a CRISPR-based approach. We detected three CRISPR loci in all studied strains. Locus1 was most popular (13/18); locus2 and locus3, as two activity loci, were only detected at least one in 5 serotype 1/2b strains. Locus1, a putative remnant of a functional CRISPR ancestor, was beared unconserved repeats (DR1) and a few of spacers; locus2 and locus3, relative new functional structures, were beared conserved repeats (DR2, DR3) and fast growing number of spacers. In all, 2 strains contained all three loci, 3 strains contained the first 2 of the three loci, as well as 8 strains only contained the first one locus, and 5 strains did not find any CRISPR structure. As the diversity of CRISPR arrays, 18 strains typed to 5 clusters (A~F), and 4 subset clusters (A1 and A2, B1 and B2). CRISPR typing can be good used in differentiating serotype 1/2b strains. In other hands, the CRISPR structures, especially that beared more spacers, enhance the host's environmental adaptability, enlarged the clear difficulty in food processing, alarm the food safety. The government should reinforce the control of these kinds of *L. monocytogenes*.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; lineage; clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR); serotype

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种重要的食源性条件致病菌, 是研究人体与病原菌相互作用的重要生物模型。LM 菌主要感染免疫妥协个体 (HIV 病人, 老年人, 婴儿和孕妇),  
收稿日期: 2014-01-14

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目 (2012BAD28B09; 2014BAD13B00)

作者简介: 狄慧玲 (1984-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食源性病菌的快速检测及其分子生物学特性研究

通讯作者: 石磊 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性病原菌快速检测与诊断

引发李斯特菌病<sup>[1]</sup>, 大多数感染是通过食物, 且死亡率很高 (~30%)。Vázquez-Boland et 的报告<sup>[3]</sup>显示在欧洲和美国李斯特菌病的发病率为每年 0.2~0.8/100000。我国由于缺乏系统的李斯特菌病流行病学资料, 目前无法评估其危害的严重性。

通过系统进化、生态和表型特征可将 LM 菌分为四个遗传谱系 (lineages) 12 种血清型<sup>[4-6]</sup>。其中, 谱系 I (1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e 和 7) 的菌株是人类临床和爆发流行的主要致病菌; 谱系 II (1/2a, 1/2c, 3a 和 3c) 的菌株是人类和动物偶发病例的常见菌株; 谱系 III 和 IV (4a

和4c)的菌株少见,主要感染动物。谱系I的菌株生存环境简单,序列相似性高,毒性强,进化地位低<sup>[7-8]</sup>。约90%以上的人类李斯特菌病是由感染血清型4b和1/2b的菌株引发的<sup>[9]</sup>。

规律成簇的间隔回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats, CRISPR)是在细菌和古细菌中普遍存在的获得性免疫防御机制,通过插入自身基因组CRISPR loci的外源侵染DNA的序列引导,干扰噬菌体和质粒等外源可转移元件对菌体自身的侵袭。CRISPR/Cas系统有三个重要组件:同向重复序列(repeat)与间隔序列(spacer)构成的CRISPR基因座(CRISPR array);前导序列(leader);CRISPR相关蛋白基因(*cas genes*, CRISPR associated-proteins)。CRISPR/*cas*系统在LM菌的一些菌株中已有发现<sup>[4,8]</sup>。本研究针对我国河北省2177份零售食品样本中检出的18株LM谱系I菌株的CRISPR array进行调查研究,旨在深入解析我国食品中流行的LM菌高毒力菌株,对今后监测和防治食源性李斯特菌病提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

2005年,河北省加入了国家食源性致病菌监测网,对省内食品中的食源性致病菌进行了连续的主动监测。从2005~2007年河北省疾病预防控制中心在全省七大类零售食品(生肉、熟肉、速冻米面制品、非发酵豆类制品、乳制品、水产品和蔬菜)中共采集2164份样本,共检出91株LM菌,检出率为4.25%<sup>[16]</sup>,其中18株(检出率0.83%)经血清型鉴定进化上属于谱系I(serotype 1/2b和4b)为本研究的实验菌株,菌株信息见表1。

### 1.2 主要仪器

梯度Icycler Thermal Cycler PCR仪(Bio-RAD); SmartSpec™plus紫外分光光度计(Bio-RAD);凝胶成像分析系统UNIVERSAL HOOD II, (Bio-RAD)。

### 1.3 培养基和主要试剂

TSB培养基,美国BD公司;脑-心浸萃液态培养基(BHI),广东环凯微生物科技有限公司;培养基脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒,德国QIAGEN公司;Ex Taq DNA聚合酶、dNTP、10×PCR反应缓冲液;pMD20-T cloning kit,日本TAKARA公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 DNA提取

按照Qiagen公司DNA提取试剂盒说明依次提取18株实验菌株的DNA,并利用OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值来确定DNA的纯度。提取到的DNA样品分装后,-20℃冰箱保存。

表1 实验菌株来源

Table 1 The source of strains in this experiment

菌株	血清型	采样地点	食品来源	采样时间
L1	1/2b	邯郸	生肉	2005/8/9
L2	1/2b	邯郸	熟肉	2006/7/20
L3	1/2b	廊坊	熟肉	2005/9/10
L4	1/2b	廊坊	熟肉	2005/9/10
L5	1/2b	廊坊	熟肉	2005/9/10
L6	1/2b	廊坊	熟肉	2005/9/10
L7	1/2b	秦皇岛	熟肉	2005/9/10
L8	1/2b	秦皇岛	熟肉	2005/8/9
L9	1/2b	石家庄	蔬菜	2005/8/19
L10	1/2b	石家庄	熟肉	2005/10/24
L11	1/2b	石家庄	生肉	2005/10/22
L12	4b	石家庄	熟肉	2005/8/29
L13	4b	唐山	熟肉	2005/10/22
L14	4b	秦皇岛	速冻米面食品	2006/5/21
L15	4b	秦皇岛	速冻米面食品	2006/5/21
L16	4b	保定	速冻米面食品	2006/5/15
L17	4b	保定	速冻米面食品	2006/5/15
L18	4b	保定	速冻米面食品	2006/5/15

#### 1.4.2 单核细胞增生李斯特菌CRISPR loci引物设计

根据CRISPR database (<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>)公布的*L. monocytogenes* Jo161 (Genebank: NC\_017545)的3个CRISPR loci信息,运用生物软件primer 5.0设计3对引物(表1),所设计的引物序列都在<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>网站进行同源性检索,确保每一对引物对所有单核细胞增生李斯特菌相应CRISPR locus扩增的特异性和兼并性。引物合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

#### 1.4.3 单核细胞增生李斯特菌CRISPR loci序列的PCR扩增和测序

##### 1.4.3.1 退火温度优化

分别以18株LM菌DNA为模板,在退火温度50℃~60℃之间对目的片段进行PCR扩增,确定二者的最佳退火温度。

##### 1.4.3.2 反应条件

因LM菌一些菌株整合的CRISPR locus2和locus3片段长度较大,为了保证所有具有该基因座位的菌株

PCR反应的成功, 本研究适当延长扩增locus2和locus3 95 °C 变性5 s, 对应表1的退火温度, 退火20 s, 72 °C 的延伸时间。具体反应条件为: 94 °C 预变性1 min, 延伸3 min, 30个循环, 72 °C 延伸10 min。

表2 CRISPR loci 扩增的引物及其最佳退火温度

Table 2 Primers used for amplifications of CRISPR loci and the best annealing temperatures

CRISPR	Name	Sequence (5'-3')	the best annealing temperature/°C
LOCUS1	P1	TTGAGGTAAGATGGGAGTAAG	47.0
	P2	ACAGATTGCTCGTTTACTA	
LOCUS2	P3	TTCGCAATACCAAACCTCG	50.3
	P4	AAGGTGAAATAACTCCAGCA	
LOCUS3	P5	GGGTCTATTGGGCTGGTG	53.7
	P6	TTGGGTCTATTGGGCTGG	

1.4.3.3 测序

将所有扩增阳性的PCR产物, 送上海美吉生物医药科技有限公司纯化测序。

1.4.4 序列分析和同源性分析

1.4.4.1 序列分析

测序结果用CRISPRs finder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>) 进行分析, 对于一些questionable CRISPR array 的残基, 因其不具备保守的repeats, 需进行人工比对。

1.4.4.2 spacers同源性分析

所有spacers都通过Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 需找与其同源的DNA序列。

2 结果与分析

2.1 引物退火温度确定

分别表1中对应的引物对*L. monocytogenes* L1基因组DNA进行梯度退火温度扩增, 对退火温度梯度设定, 结果如图1所示。由图1可知, 3对引物的扩增产物效率均随着温度有递增或有非特异性扩增, 最终分别确定三对引物的最佳退火温度为CRISPR locus1, 54.3 °C; CRISPR locus2, 51.1 °C; CRISPR locus3, 54.6 °C。

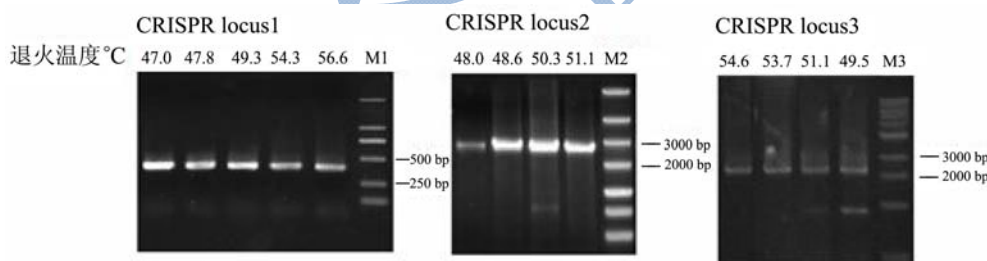


图1 温度梯度 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Agarose gel pattern of gradient PCR products

Note: M1. DL2000 DNA Marker; M2. DL5000 DNA Marker; M3: Mark 1Kb DNA Ladders .

2.2 CRISPR序列的扩增与测序

按照最佳退火温度, 分别用表1对应的引物对18株食品中检出的谱系I的LM菌的CRISPR序列进行PCR扩增, 扩增产物电泳结果见图2。三个CRISPR loci共得到29个有效扩增, 其中locus1, 13个; locus2; 14个(5个特异扩增); locus3, 2个(无扩增的菌株泳道未列出)。

电泳结果显示特异性扩增的PCR产物送上海美吉生物医药科技有限公司纯化测序。测序结果显示L9、L11、L15、L16、L14、L17为非特异性扩增, 没有检出CRISPR结构。

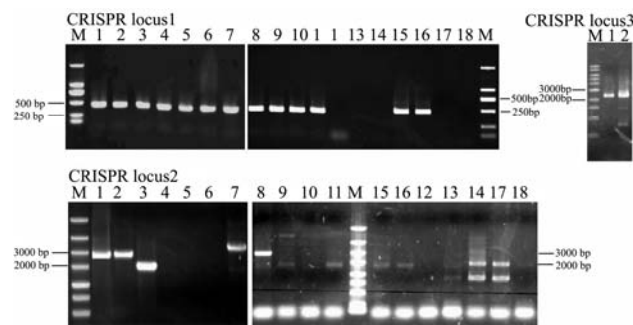


图2 三个 CRISPR loci PCR 扩增产物的电泳图

Fig.1 Electrophotogram of the three CRISPR loci

Note: CRISPR locus1 M: DL2000 DNA Mark; CRISPR

locus2 M: DL5000 DNA Mark; CRISPR locus3 M: Mark 1Kb DNA Ladders.

### 2.3 序列分析

测序结果输入 CRISPRs finder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>)确认CRISPR的repeat-spacer阵列排布,对于CRISPR finder检测无效的序列,再通过人工矫正确认,具体见图3、4、5。将locus1、locus2和locus3相对应的保守 repeat 序列分别命名为: DR1 (5'-GTTTTAGTTACTTATTGTGAAATGTAAAT-3') DR2 (5'-GTTTTAACTACTTATTATGAAAT GTAAAT-3') 和 DR3 (5'-GTTTTGGTAGCATTCAAATA ACATAGCTCTAAAAC-3')。

由表 2 可知, CRISPR locus1 在所有血清型 1/2b 的菌株中普遍存在,而血清型 4b 的菌株只有两株 (L15, L16) 有扩增,其余 5 株未见扩增。图 3 显示,从 13 株实验菌中检出的 locus1 呈现 3 种 repeat-spacer 排布方式 (CRISPR arrays, 分别为 *L. monocytogenes* L312 型 (10 株除 L11 外的所有血清型 1/2b 的菌株)、*L. monocytogenes* 4b F2365 型 (2 株, L15, L16) 和 *L. monocytogenes* 1/2a EGD-e 型 (1 株 L11))。EGD-e 型 (L11) 具有相对保守的 repeat 序 DR1, 有 4 条特有的 spacer 序列, 其中 spacer3 与 bacteriophage B054 序列同源; L312 型和 F2365 型仅在第三条 spacer 上有一个碱基差异, 与 EGD-e 型 DR1 保守序列相比, 二者的 repeats 序列均呈现 1~3 个碱基突变或缺失, 仅有 3 条 spacer 序列, 且与 EGD-e 型完全不同, 未发现与其同源的噬菌体或质粒序列。因 spacer 的来源和数量在一定程度上可反应出细菌的进化历程, 反应菌株生存环境的差异<sup>[10]</sup>, 我们推测 L11 是进化上相对更古老的菌株。此外, CRISPR locus1 曾经在 1/2a EGD-e 菌株中被表述为小的 non-coding RNA RliB, 有控制毒力的作用<sup>[12-13]</sup>, 本研究有 5 株 4b 血清型菌株缺失该基因座位, 可能因此而使它们的毒力增强, 成为食物链中更危险的因素。这也许可以解释 4b 是大规模李斯特菌病流行爆发最常见血清型<sup>[4]</sup>。

我们共检出 5 株具有 CRISPR locus2 的菌株, 分别为 L1、L2、L3、L7、L8, 血清型均为 1/2b; 44 特有的 spacers 由图 4 可知, L1 和 L2 的 CRISPR array 完全相同, 可认为来自同一克隆株; 二者仅与 L8 有 3 条不同的 spacers (图 4 红色字体标示), 提示三菌株可能进化自共同的祖先, 中间因经历不同的生存环境而插入了不同的 spacers 序列, 其中 L8 额外插入的两条 spacer 中有 1 条与 *L. monocytogenes* 08-5578 (Genebank: NC\_013766) 的前噬菌体 DNA 同源, 证明

L8 曾在此期间收到该噬菌体的攻击。L3 和 L7 同源, 可能进化自同一祖先, 其中 L7 的 spacer 数目更多, 且有 10 条为其特有, 提示其经历了更复杂的生存环境。有趣的是, 在菌株 L7 中该基座有 6 组 repeat-acer 基元的重复, 之前的研究在嗜热链球菌中也有发现此类现象, 这为 CRISPR 结构是通过基因水平转移从一个菌体向另一个菌体转移的提供了有力的证据。与 locus1 相比, locus2 的 repeat 序列更为保守, 仅末端 repeat 有三个碱基的突变。此外, 据文献<sup>[11]</sup>报道, 该位点上游伴有 7 个 cas 基因: cas6、cst1、cst2、cas5t、cas3、cas1 和 s2, 属于 the *Thermotoga neapolitana* (Tneap) 亚型<sup>[14]</sup>, 这表明该基因座位是一个有功能的 CRISPR 结构, 因而其 spacer 呈现复杂的多样性。

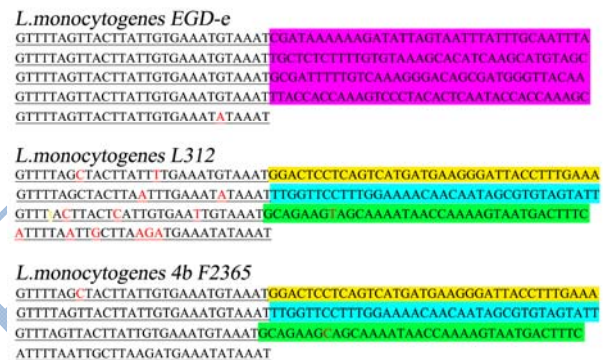


图 3 CRIPR locus1 阵列图谱

Fig.3 CRIPR locus1 arrays

注: 下划线: repeats 序列, 红色字体: 突变碱基, 黄色字体: 缺失碱基; 彩色阴影: spacers 序列, 红色字体: 差异碱基。

CRISPR Locus3 仅在菌株 L1 和 L2 中检出, 进一步证明两菌株可能来自同一克隆。相对 locus1 和 locus2, 该座位位于单核细胞增生李斯特菌基因组 DNA 反义链上, repeat 序列也很保守, 仅末端 repeat 有三个碱基突变。菌株 L1 和 L2 的 locus3 CRISPR array 与 *L. monocytogenes* finland 1998 (Genebank: NC\_017547) 相似, 开始四条和末尾 7 条相同, 仅 spacer5 为前两者所特有, 与噬菌体 A118 序列同源, 代表其曾经被噬菌体 A118 的侵袭。据文献<sup>[11]</sup>报道, Locus3 伴有 4 个 cas 基因: *csn2*, *cas2*, *cas1* 和 *csn1*, 属于 *Neisseria meningitidis* (Nmeni) 亚型。该亚型依赖于 *csn1* 上游的 *trans-encoded sRNA* (tracrRNA) 和宿主的 RNase III 补偿自身缺少的 *endoribonuclease gene*<sup>[2]</sup>。该 CRISPR 功能的发挥需要宿主基因组中能表达 RNase III。

根据三个 CRISPR loci 在 18 株实验菌株中的存在与否和阵列排布, 我们将它们聚为 5 大类 (Cluster A-F), 其中 Cluster A 和 B 又各自分为两个的亚型, 详见表 2。A~E 型菌株都有 CRISPR locus1, 其中, A、B 和 C 型菌株的 locus1 相同, D 和 E 型菌株各自不同, F 型菌株未检



接上页

		Locus 3	-	-	-	
L4, L5,		Locus 1	29	3	同 F2635	C
L6, L9,	1/2b	Locus 2	-	-		
L10		Locus 3	-	-		
		Locus 1	29	4	同 EGD-e	D
L11	1/2b	Locus 2	-	-		
		Locus 3	-	-		
		Locus 1	29	3	同 L312	E
L14, L15	4b	Locus 2	-	-		
		Locus 3	-	-		
		Locus 1	-	-		F
L12, L13,	4b	Locus 2	-	-		
L16, L17,		Locus 3	-	-		
L18						

注: 如图 3, 4, 5 所示; -代表不具备该结构。

### 3 结论

3.1 CRISPR数据库中, LM菌基因组中共发现三个CRISPR loci<sup>[15]</sup>, 本研究18株谱系I (serotype 1/2b和4b)的菌株中均有检出。其中残缺的locus1最普遍, 在13株菌中检出; 18株菌中有5株至少具有两个活性loci (locus2和locus3)的一个, 但仅限于在血清型1/2b的菌株, 在4b菌株中未检出。Spacer的多样性在一定程度上能反映该CRISPR结构的活性<sup>[11]</sup>, locus1是退化的残基, 仅有8条不同的spacers, 各菌株之间同源性高, 这是因为在进化的早期缺失了其相关的cas基因, 丧失了丰富自身的能力; locus2和locus3是新兴的CRISPR结构, 活力旺盛, 分别有共44和12条不同的spacer, 伴随菌株生存环境的变化, 将呈现更复杂的多样性。我们因其排列的多样性, 18株菌聚类分型为5簇, 能较好的对1/2b血清型的菌株进行分型研究,

3.2 CRISPR/Cas系是一类附加的用于防御噬菌体等袭击的防御线路, 可以通过基因水平转移获得, 似乎只能在LM菌的某些菌株中发挥作用。CRISPR-arrays多变的特征可用于通过菌株分型, 对今后针对我国食源性单核细胞增生李斯特菌爆发菌株的追踪溯源提供有力的依据; 同时由于该系统的插入致使高毒力的单核细胞增生李斯特菌谱系I菌株对环境适应能力增强, 今后有可能会造成更严重的食品安全隐患, 因此相关部门应加强对该类菌的监管力度。

### 参考文献

[1] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection [J]. Clin. Microbiol. Infect., 2010, 16: 16-23

[2] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471: 602-607

[3] Vázquez-Boland J, Kuhn M, Berche, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clin. Microbiol. Rev., 2001, 14: 584-640

[4] Hain T, Ghai R, Billion A, et al. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes* [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 144

[5] Orsi R H, den Bakker H C, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. Int. J. Med. Microbiol., 2011, 301: 79-96

[6] Doumith M, Cazalet C, Simoes N, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays [J]. Infect. Immun., 2004, 72: 1072-1083

[7] den Bakker H C, Didelot X, Fortes E D, et al. Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes* [J]. BMC Evol. Biol., 2008, 8: 277

[8] Orsi R H, Sun Q, Wiedmann M. Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes* [J]. BMC Evol. Biol., 2008, 8: 233

[9] Swaminathan B, Gerner-Smidt P: The epidemiology of human listeriosis [J]. Microbes. Infect., 2007, 9: 1236-1243

[10] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Et al. Clustered

- regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-2561
- [11] Carsten Kuenne, André Billion, Mobarak Abu Mraheil, et al. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome [J]. *BMC Evol. Biol.*, 2013, 14: 47
- [12] Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, et al. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence [J]. *Nature*, 2009, 459: 950-956
- [13] Mandin P, Repoila F, Vergassola M, et al. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35: 962-974
- [14] Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes [J]. *PLoS Comput. Biol.*, 2005, 1: e60
- [15] I Grissa, G Vergnaud, C Pourcel. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007 8(1): 172
- [16] 侯凤伶,申志新,申玉学,等.河北省食源性致病菌监测网的建立及主动监测结果分析[J].*中国卫生检验杂志*, 2008,18(2):225-228
- HOU Fei-ling, SHEN Zhi-xin, SHEN Yu-xue, et al. Establishment of active surveillance network in Hebei and study on active monitoring for food-borne pathogens [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(2): 225-228