



引用格式:胡金强,雷俊婷,景建洲,等. 食源性致病菌 PCR 检测技术研究进展[J]. 轻工学报,2016,31(3):49-56.

中图分类号:TS207.4 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.3.007

文章编号:2096-1553(2016)03-0049-08

# 食源性致病菌 PCR 检测技术研究进展

## Advance in PCR detection technologies for foodborne pathogenic bacteria

胡金强<sup>1,2,3</sup>,雷俊婷<sup>1</sup>,景建洲<sup>1</sup>,孙新城<sup>1</sup>,高辉<sup>1</sup>,耿尧<sup>1</sup>,  
章银良<sup>1</sup>,董彩文<sup>1</sup>,姜春鹏<sup>1</sup>

HU Jin-qiang<sup>1,2,3</sup>,LEI Jun-ting<sup>1</sup>,JING Jian-zhou<sup>1</sup>,SUN Xin-cheng<sup>1</sup>,GAO Hui<sup>1</sup>,  
GENG Yao<sup>1</sup>,ZHANG Yin-liang<sup>1</sup>,DONG Cai-wen<sup>1</sup>,JIANG Chun-peng<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 食品生产与安全河南省协同创新中心,河南 郑州 450001;
3. 河南省食品安全国际联合实验室,河南 郑州 450001

1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China;

3. He'nan International Joint Laboratory for Food Safety, Zhengzhou 450001, China

### 关键词:

食源性致病菌;PCR  
检测技术;食品安全

### Key words:

foodborne pathogenic  
bacteria;PCR detection  
technology;food safety

**摘要:**食源性致病菌是诱发食品安全问题的重要隐患,在众多食源性致病菌检测技术中,PCR 检测技术因具有特异、敏感、简便、快速等优点而得以广泛应用。然而现有的包括多重 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术、多重实时荧光定量 PCR 技术、IMS-多重实时荧光定量 PCR 技术、PCR-ELISA 技术、EMA/PMA-PCR 技术和 DPO-PCR 技术等在内的食源性致病菌 PCR 检测技术及其衍生技术仍存在成本高、效率低、质控差等缺陷,未来应向高灵敏度、高特异性、高通量、高重复性、简易、经济方向发展,以适应食源性致病菌对检测技术的要求。

收稿日期:2015-05-20

**基金项目:**国家自然科学基金项目(31201901);教育部留学回国人员科研启动基金项目(教外司留[2013]693号);河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(教高[2015]1032号);河南省教育厅科学技术重点研究项目(14A180025);郑州市科技攻关项目(20130857);郑州轻工业学院博士基金项目(2011BSJJ033);郑州轻工业学院青年骨干教师资助计划项目(2013QNGG02);郑州轻工业学院研究生创新基金项目(2014031)

**作者简介:**胡金强(1979—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为病原生物学、免疫学与食品安全。

**Abstract:** Foodborne pathogenic bacteria is the hidden danger of food safety. During many detection methods, PCR and PCR-derived technologies have advantages of sensible, specific, convenient and rapid, which have been widely used in the detection of foodborne pathogenic bacteria. At present, PCR detection technologies including multiple PCR, real-time PCR, multiple real-time PCR, IMS-multiplex real-time PCR, PCR-ELISA, EMA/PMA-PCR and DPO-PCR have defects such as high cost, low efficiency and poor quality control and need to be improved to meet the requirements of high sensibility, high specificity, high throughput, high reproducibility, convenience and economics for the detection of foodborne pathogenic bacteria.

## 0 引言

近年来,国内外食品安全形势严峻,食品安全事件频发,严重影响人们的身心健康与安全,也制约了食品工业的健康发展,其中食源性致病微生物所导致的食品安全问题占据了相当大的比重。而在人类的食物链中,大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌等是极其重要的食源性致病菌<sup>[1]</sup>。

德国2011年5月爆发由食源性肠出血性大肠杆菌 O104:H4 感染引起的溶血性尿毒综合征(HUS),确诊和疑似病例达2 000余例,死亡24例,疫情迅速蔓延至欧洲及美洲的15个国家<sup>[2]</sup>。美国2011年下半年爆发一起由单增李斯特菌引起的食源性疾病事件,确诊病例达109例,波及美国24个州,是近十年来美国最严重的一起食源性疾病爆发事件<sup>[3]</sup>。我国也同样面临这样的食品安全问题,卫生部每年能接到300—500件重大食物中毒事件的报告,共引起数百人死亡、1万多人中毒,食品工业的健康发展、消费者对食品行业的信心都受到很大的影响。因此,建立快速、灵敏的致病菌检测方法,控制食源性疾病,减少食品安全事件的发生势在必行。

传统致病菌检测方法由于操作步骤繁琐、周期长,已无法满足快速发展的食品行业对检测技术的需求<sup>[4]</sup>。目前,食源性致病菌检测技术已由培养水平向分子水平方向发展,其中,PCR (Polymerase Chain Reaction) 检测技术因其能够大幅度提高检测的特异性与灵敏度,并具有高

通量、低成本、快速等优点,在食源性致病菌检测领域具有广阔的发展前景<sup>[5]</sup>。本文就国内外食源性致病菌的PCR检测技术进行综述,以期为进一步开展食源性致病菌的快速鉴定、检测,以及食源性疾病的预防、诊断、治疗提供参考。

## 1 PCR 检测技术

### 1.1 传统 PCR 技术

传统PCR技术通过体外控温,将样品中的靶基因进行变性、退火与延伸,可使极少量特定基因片段扩增数百万倍。

杨晋等<sup>[6]</sup>通过筛选构建的扩增内标确定内标添加量,应用新体系检测人工污染沙门氏菌的灵敏度可达3.2 CFU/mL,整个实验过程仅需8 h 增菌培养即可实现对沙门氏菌100%的特异性检出,同时能够有效避免假阴性结果。王丽丽等<sup>[7]</sup>利用标记生物素与地高辛的引物,以及包被亲和素与抗地高辛抗体的层析试纸条对扩增产物进行检测,通过肉眼即可对红色条带进行结果判读,可替代对扩增产物的电泳分析与检测操作,实现一步法检测,操作方便。

目前,传统PCR技术已广泛应用于食源性致病菌检测的各个领域,对培养困难、损伤严重及抗原结构复杂的致病菌检测具有显著优势<sup>[8]</sup>。然而,传统PCR技术在特异性、准确度等方面仍存在不足,需要进一步优化反应体系和反应条件,以实现特异性强、准确度高的检测<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2 多重 PCR 技术

多重PCR (multiplex PCR) 技术也称复合

PCR 技术,是从传统 PCR 技术基础上发展起来的,即在同一个反应体系中加入多对引物,同时扩增出多个靶基因片段,进而对多种致病菌或同一致病菌的多种靶基因进行特异性检测。

C. Timmons 等<sup>[11]</sup>通过在引物的 5' 端加入一段富集 AT 的短基因片段对其进行修饰,在食源性致病菌检测中,经引物修饰的多重 PCR 技术比普通多重 PCR 技术的灵敏度提高 10 ~ 100 倍,该方法可同时检测大肠杆菌 O157 : H7 与沙门氏菌,检出限分别可达 100 CFU/mL 和 10 CFU/mL,已达到同时检测这两种病菌灵敏度的最高水平. M. Chandra 等<sup>[12]</sup>利用纯化的 DNA 模板,通过优化退火温度、引物浓度等条件,实现单管菌落 PCR 技术一步法同时检测大肠杆菌与沙门氏菌,并可区别大肠杆菌的所有致病型,由于利用了热启动 PCR 技术,以大肠杆菌肠杆菌科致病型作为阳性对照,能够有效避免假阳性结果,特异性强。

多重 PCR 技术能够同时检测多种食源性致病菌,具有简便、高效、快速、高通量、省费用等优点<sup>[13]</sup>. 另外,该技术通过优化设计引物与 PCR 反应条件,可进一步实现特异性强、灵敏度高的检测目的,目前已广泛应用于食源性致病菌检测及流行病学调查等领域<sup>[14]</sup>,但其敏感性不强,还有凝胶电泳污染<sup>[15]</sup>.

### 1.3 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术是在传统 PCR 体系中加入荧光基团,利用荧光信号的出现顺序与强弱变化即时分析靶基因的拷贝数,再利用标准曲线对比已知量的标样,实现对未知样品实时定量检测的技术。

L. J. Wang 等<sup>[16]</sup>利用叠氮溴化丙啶(PMA)和脱氧胆酸盐消除死细胞或损伤细胞的干扰,采用免疫磁珠分离法(IMS)有效捕获与富集目的致病菌,并通过实时荧光定量 PCR 技术对大肠杆菌 O157 : H7 进行定量检测,所建立的

IMS-SD-PMA-qPCR 方法能够大幅缩短检测时间、提高灵敏度,检出限达 100 CFU/mL. M. S. Cho 等<sup>[17]</sup>利用编码调控蛋白基因的 DNA 序列作为靶基因,能够鉴别大肠杆菌 O157 血清的类型,特异性强,灵敏度可达 37 ~ 370 CFU/mL. 该法可避免利用传统目的基因(stx, slt, eae, hlyA, rfb 与 fliCH7 等)作为模板引发的检测结果缺乏特异性与灵敏度的问题。

实时荧光定量 PCR 技术可实现在封闭体系内扩增与实时定量检测,大幅降低污染的可能性. 该技术无需凝胶电泳步骤,操作简便,且具有特异性强、灵敏度高、准确度高、操作自动化等优点,在食源性致病菌检测中的应用越来越广泛<sup>[18-19]</sup>. 实时荧光定量 PCR 技术成本高,需要昂贵仪器,检测致病菌单一<sup>[20]</sup>.

### 1.4 多重实时荧光定量 PCR 技术

多重实时荧光定量 PCR 技术是高通量的多重 PCR 技术与高灵敏度的实时荧光定量 PCR 技术相结合的新技术<sup>[21]</sup>. 该技术在常规实时荧光定量 PCR 体系的基础上加入多条特异性引物,可实现对多种致病菌或单一致病菌的多个靶基因的实时定量检测。

P. Cremonesi 等<sup>[22]</sup>利用水解探针、高度保守的 16S rRNA 基因与毒力基因设计引物,以致病菌株作为阳性对照,非致病菌株作为阴性对照,能够有效避免假阳性与假阴性检测结果,可同时检测 20 种食源性致病菌,检出限达 1 CFU/mL,将该方法应用于人工污染食品样品检测,检出限可达 100 ~ 1 000 CFU/mL. R. Gordillo 等<sup>[23]</sup>利用 mRNA 对大肠杆菌 O157 : H7 细胞生存能力进行衡量,以 mRNA 与 DNA 为靶基因,在未富集细菌的条件下,人工污染食品样品的检出限达 10 ~ 100 CFU/g;若 37 °C 富集培养细菌 4 h,最低检出限达 1 CFU/g,灵敏度较高。

多重实时荧光定量 PCR 技术能够同时对

多种食源性致病菌进行实时定量检测,并且具有特异性强、灵敏度高、准确度高、操作简便、高通量等优点<sup>[24]</sup>。目前,在食源性致病菌的检测中多重实时荧光定量 PCR 技术已得到快速发展<sup>[25]</sup>。但同时多重实时荧光定量 PCR 技术具有检测成本高、需要昂贵仪器的缺点<sup>[26]</sup>。

### 1.5 免疫磁珠 - 多重实时荧光定量 PCR 技术

免疫磁珠 - 多重实时荧光定量 PCR 技术是将免疫磁珠分离技术(IMS)与多重实时荧光定量 PCR 技术相结合的新技术<sup>[27]</sup>。该技术利用偶联特异性抗体的磁珠与目的菌的抗原抗体进行反应,有效分离目的菌,进而对多种致病菌或单一致病菌的多个靶基因进行高特异性的实时定量检测。

马凯等<sup>[28]</sup>利用纳米免疫磁球循环捕获靶细菌,提高分离与富集效率,通过溶菌酶破壁及增菌阶段加入 1% 甘氨酸抑制细胞壁生长,显著提高革兰氏阳性菌 DNA 的提取率;采用 BHQ 系列作为 PCR 探针的淬灭基团,避免由基团本身发射的荧光对实验的干扰,灵敏度较高,且可同时检测 3 种致病菌,检出限均低于 10 CFU/g。G. M. Baranzoni 等<sup>[29]</sup>利用大肠杆菌 O104 特异性磁珠与乳胶凝集试剂偶联抗体,提高分离与检测的特异性,传统 PCR 技术无法检测经低温(4 ℃)处理 48 h 的食源性致病菌,应用该方法则能够准确识别靶细菌,并且对人工污染食品样品的检出限低于 1 CFU/g,灵敏度较高。

免疫磁珠分离技术是一种将食源性致病菌分离与富集的敏感而简单的方法<sup>[30-31]</sup>,将其与多重实时荧光定量 PCR 相结合的免疫磁珠 - 多重实时荧光定量 PCR 技术,实现了无需预增菌即可高特异性、高灵敏度、高准确度、高通量、快速、实时地检测多种食源性致病菌,在食源性致病菌检测领域具有广阔的发展前景<sup>[32]</sup>,但其检测成本高<sup>[33]</sup>。

### 1.6 PCR-ELISA 技术

PCR-ELISA 技术是将传统酶联免疫吸附测定(ELISA)技术与 PCR 技术相结合的一种新型检测技术<sup>[34]</sup>。该技术是致病菌基因序列经 PCR 扩增后,在微孔板上运用 ELISA 原理与酶标抗体进行固相或液相杂交,进而实现对靶基因高特异性与高灵敏度定量检测的技术。

王丹等<sup>[35]</sup>在常规 PCR-ELISA 技术基础上,对引物与探针均进行标记,使得新体系的特异性再度增强,从而有效避免假阳性与假阴性的干扰。该技术对大肠杆菌 O157:H7 的最低检出限达 0.04 CFU/mL,灵敏度高。Y. H. Li 等<sup>[36]</sup>利用两种种属特异性基因设计引物,利用不同 PCR 循环次数的细胞产量与 OD 值的关系建立回归方程组,并以最佳线性关系确定循环次数与检出限。该方法用于人工污染婴幼儿奶粉的阪崎肠杆菌检测中,在未预增菌条件下的检出限为  $1.06 \times 10^3$  CFU/mL(传统 PCR 技术的检出限为  $1.06 \times 10^6$  CFU/mL),经 10 h 预增菌后的检出限为 1 CFU/mL,灵敏度较高。

PCR-ELISA 技术比需要电泳检测的传统 PCR 技术的灵敏度高 10 ~ 100 倍,酶标仪读出结果客观,主观干扰小,而且无需在 PCR 扩增后对 DNA 产物进行电泳检测<sup>[37]</sup>。此外,该技术还具有特异性强、操作简单、费用少等优点,现已应用于多种食源性致病菌检测领域<sup>[38]</sup>。PCR - ELISA 技术操作周期较长,无法同时检测多种食源性致病菌<sup>[39]</sup>。

### 1.7 EMA/PMA-PCR 技术

EMA/PMA-PCR 技术是将 DNA 染料叠氮溴化乙锭(EMA)或叠氮溴化丙锭(PMA)与传统 PCR 技术相结合,通过抑制死菌基因的扩增,从而实现高特异性扩增活菌靶基因检测的技术。

P. Elizaquivel 等<sup>[40]</sup>利用 DNA 染料与 DNA 分子的结合特点,通过优化 DNA 染料(PMA 与

脱氧胆酸盐)的浓度配比,得到抑制3种致病菌90%以上活细胞的最佳浓度,进而利用PCR技术进行特异性检测.该方法可同时检测经大肠杆菌O157:H7和沙门氏菌及李斯特菌污染的食品样品,检出限可达100 CFU/g. VBNC(viable but non-culture)指处于“活的但非可培养”状态的微生物,此微生物体的细胞仍有代谢活性,但用传统PCR技术无法分离培养<sup>[41]</sup>. L. D. Dinu等<sup>[42]</sup>通过外界施以低温,利用致病菌混合物中死活细胞比例的检测信号对引物进行筛选,进而实现国内外首次通过PMA-PCR技术的VBNC细胞定量检测,该方法对大肠杆菌O157:H7的检出限达1 000 CFU/g.

EMA/PMA-PCR技术利用EMA/PMA对活菌与死菌进行区分,再运用PCR技术特异性地扩增活菌,进而有效避免漏检与假阳性检测结果<sup>[43-44]</sup>.该方法具有灵敏度高、准确性好、操作简单、高效、快速等优点,在食源性致病菌检测领域具有广阔的应用前景<sup>[45]</sup>,但其仅能检测单一食源性致病菌<sup>[46]</sup>.

### 1.8 DPO-PCR技术

DPO-PCR技术是利用高特异性的DPO引物替代传统PCR引物进行PCR扩增的新型检测技术<sup>[47]</sup>.

徐义刚等<sup>[48]</sup>以大肠杆菌O157:H7的rfbE基因为靶基因设计一对DPO引物,与传统PCR引物相比,DPO引物不需要对引物参数与退火温度进行反复优化,仍能够保持高效扩增,并能有效避免假阳性结果,该方法对大肠杆菌O157:H7的检出限达94 CFU/mL. Y. G. Xu等<sup>[49]</sup>利用DPO引物与DNA模板脱离,终止PCR反应,进而有效阻断非特异性扩增与假阳性的检测结果,特异性较强,以单增李斯特菌的iap基因作为靶基因设计特异性DPO引物,新建立的DPO-PCR反应体系的退火温度范围为48~68℃,无需对反应体系进行优化,对单增

李斯特菌的检出限达151 CFU/mL,灵敏度高.

DPO引物自身及引物之间很少形成二级结构,故无需优化引物参数,操作步骤简单<sup>[50]</sup>. DPO-PCR技术具有退火温度范围宽、特异性强、设计简单等优点,在食源性致病菌检测中具有较高的应用价值与广阔的应用前景<sup>[51]</sup>. DPO-PCR技术敏感性不高,无法实现高通量的检测.

## 2 结语

传统的食源性致病菌检测技术(如分离培养、生化鉴定)无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测,存在特异性差、操作繁琐、耗时等缺点,无法实现及时有效的检测.随着分子生物学的快速发展,PCR技术及其衍生技术已成为国内外食源性致病菌检测领域的研究热点,但这些技术仍然存在一定的缺陷,例如,多重PCR技术较易产生假阳性与假阴性检测结果,实时荧光定量PCR技术成本较高,免疫磁珠-多重实时荧光定量PCR技术较易产生杂菌交叉反应,PCR-ELISA技术污染问题较严重等.因此,这些技术仍需进一步完善,以促进PCR技术及其衍生技术在食源性致病菌检测中的应用与推广.

总之,在不久的将来,食源性致病菌的检测技术将逐步向灵敏度高、特异性强、通量高、重复性好、简易、经济的方向发展,为我国开展食源性致病菌的快速鉴定、检测,以及食源性疾病的预防、诊断、治疗提供可靠的检测手段.这将为公共卫生、营养健康、饮食习惯、疾病预防事业以及食品工业的健康快速发展做出贡献.

### 参考文献:

- [1] XU Y G, CUI L C, TIAN C Y, et al. A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for

- simultaneous detection of six foodborne pathogens[J]. Food control, 2012, 25(2):778.
- [2] IJIMA Y, HONDA T. Characteristics and molecular biology of verotoxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. [J]. Nippon rinsho, 1997, 55(3):646.
- [3] 赵玉洁. 以科学精神共同应对全球挑战——2012年国际食品安全论坛在京举办[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9):16.
- [4] ABUBAKAR I, IRVINE L, ALDUS C F, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food [J]. Health technology assessment, 2007, 11(36):1.
- [5] BABU L, REDDY P, MURALI H S, et al. Optimization and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of prominent foodborne pathogens of *Enterobacteriaceae* [J]. Annals of microbiology, 2013, 63(4):1591.
- [6] 杨晋, 曾庆梅, 张笛, 等. 添加扩增内标的沙门氏菌 PCR 检测方法[J]. 生物技术通报, 2014(7):54.
- [7] 王丽丽, 赵瑜, 唐慧林, 等. 食品中单增李斯特菌 PCR-NALF 检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(11):194.
- [8] 杨胜男, 郑增忍, 张乐萃, 等. 空肠弯曲菌的培养及其 PCR 鉴定研究[J]. 动物医学进展, 2012, 33(12):138.
- [9] WANG L X, MUSTAPHA A. EMA-Real-Time PCR as a reliable method or detection of viable *Salmonella* in chicken and eggs[J]. Journal of food science, 2010, 75(3):134.
- [10] 郑鸣, 边传周, 刘仲敏. Chelex 法结合环介导间接聚合酶链式反应检测肉制品单增李斯特菌[J]. 食品科学, 2012, 33(10):190.
- [11] TIMMONS C, DOBHAL S, FLETCHER J, et al. Primers with 5' flaps improve the efficiency and sensitivity of multiplex PCR assays for the detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 : H7 [J]. Journal of food protection, 2013, 76(4):668.
- [12] CHANDRA M, CHENG P, RONDEAU G, et al. A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella* [J]. International journal of medical microbiology, 2013, 303(4):210.
- [13] WANG Y X, ZHAO P F, ZHANG H L, et al. A simple and rapid realtime PCR assay for the detection of *Shigella* and *Escherichia coli* species in raw milk [J]. Journal für verbraucher-schutz und lebensmittelsicherheit, 2013, 8(4):313.
- [14] KAO C C, LIU M F, LIN C F, et al. Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of *AmpC* genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. [J]. Journal of microbiology, immunology and infection, 2010, 43(3):180.
- [15] 魏霜, 冼钰茵, 赵晖, 等. 多重 PCR 检测四种食源性病原弧菌[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8):1682.
- [16] WANG L J, LI P, ZHANG Z H, et al. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process [J]. Food control, 2014, 36(1):119.
- [17] CHO M S, JOH K, AHN T Y, et al. Improved PCR assay for the specific detection and quantitation of *Escherichia coli* serotype O157 in water [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98(18):7869.
- [18] LEE J L, LEVIN R E. Detection of 5 CFU/g of *Escherichia coli* O157 : H7 on lettuce using activated charcoal and real-time PCR without enrichment [J]. Food microbiology, 2011, 28

- (3):562.
- [19] 杜雄伟,李叶,江洁,等.肉制品中沙门氏菌 *invA* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].食品工业科技,2013,34(12):68.
- [20] 邵美丽,许岩,刘思国,等. TaqMan 探针实时定量 PCR 检测肉中金黄色葡萄球菌的研究[J].食品工业,2013,34(3):109.
- [21] 周慧,支竹伟,刘涵,等.多重实时荧光定量 PCR 检测肴肉中的特定腐败菌[J].粮食与食品工业,2014,21(3):86.
- [22] CREMONESI P, PISANI L F, LECCHI C, et al. Development of 23 individual TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assays for identifying common food-borne pathogens using a single set of amplification conditions [J]. Food microbiology, 2014, 43:35.
- [23] GORDILLO R, RODRIGUEZ A, WERNING M, et al. Quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 in meat products by duplex real-time PCR assays [J]. Meat science, 2014, 96(2):964.
- [24] KÖPPEL R, KUSLYTE A R, TOLIDO I, et al. Nonplex real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella* and enteropathogenic *E. coli* after universal enrichment in food samples [J]. European food research and technology, 2013, 237(3):315.
- [25] 邵美丽,董鑫,赵燕丽,等.单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌双重荧光定量 PCR 检测方法建立[J].食品科学,2013,34(16):169.
- [26] 索标,滕要辉,艾志录,等.食源性致病菌多重荧光 PCR 检测扩增内标的构建及评价[J].食品与发酵工业,2011,37(8):148.
- [27] GUY R A, TREMBLAY D, BEAUSOLEIL L, et al. Quantification of *E. coli* O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection [J]. Journal of microbiological methods, 2014, 99:44.
- [28] 马凯,李宝明,白羽,等.基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J].微生物学通报,2014,41(11):2369.
- [29] BARANZONI G M, FRATAMICO P M, RUBIO F, et al. Detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104 from sprouts [J]. International journal of food microbiology, 2014, 173:99.
- [30] 闻一鸣,李志清,童吉宇,等.免疫磁珠富集技术联合选择性培养基快速检测单增李斯特菌[J].生物工程学报,2012,29(5):672.
- [31] 胡金强,雷俊婷,詹丽娟,等.免疫学技术在食源性微生物检测中的应用综述[J].郑州轻工业学院(自然科学版),2014,29(3):7.
- [32] DELBEKE S, CEUPPENS S, HOLVOET K, et al. Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil [J]. International journal of food microbiology, 2015, 193:1.
- [33] Rebecca AG, Donald T, Louise B, et al. Quantification of *E. coli* O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection [J]. Journal of microbiological methods, 2014, 99:44.
- [34] 谭炳乾,何启盖,肖军,等.建立 PCR-ELISA 方法检测单核细胞增多性李斯特菌[J].农业生物技术学报,2008,16(4):670.
- [35] 王丹,刘金华,史艳宇,等.大肠杆菌 O157:H7 PCR-ELISA 检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2014(6):128.
- [36] LI Y H, CAO L, ZHANG C, et al. Development

- and evaluation of a PCR-ELISA assay for the detection and quantification of *Cronobacter spp.* [J]. International dairy journal, 2013, 33(1): 27.
- [37] 谭炳乾, 何启盖, 肖军, 等. 建立 PCR-ELISA 方法检测单核细胞增多性李斯特菌[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 670.
- [38] PERELLE S, DILASSER F, GROUT J, et al. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157[J]. International journal of food microbiology, 2007, 113(3): 284.
- [39] 史艳宇, 刘金华, 薛力刚, 等. PCR-ELISA 法检测食品中空肠弯曲菌[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 246.
- [40] ELIZAQUIVEL P, SANCHEZ G, AZNAR R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR [J]. Food control, 2012, 25(2): 704.
- [41] 丁林贤, 苏晓梅, 横田明. 活的但非可培养(VBNC)状态菌的研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(7): 858.
- [42] DINU L D, BACH S. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157 : H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays [J]. Food control, 2013, 31(2): 268.
- [43] 高延玲, 狄元冉, 李金磊, 等. EMA 与 PCR 结合检测大肠杆菌 O157 方法的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(10): 9.
- [44] 胡金强, 雷俊婷, 詹丽娟, 等. 食源性微生物的分子生物学检测方法的研究进展[J]. 食品工业, 2014, 35(7): 201.
- [45] 刘艳艳, 柳增善, 卢士英, 等. 灭菌乳中活阪崎肠杆菌 PMA-PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 65.
- [46] Wang L J, Li P, Zhang Z H, et al. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157 : H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process [J]. Food Control, 2014, 36: 119.
- [47] THIERRY S, HAMIDJAJA R A, GIRAULT G, et al. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis* [J]. Journal of microbiological methods, 2013, 95(3): 357.
- [48] 徐义刚, 李丹丹, 崔丽春, 等. 应用 DPO-PCR 技术检测肠出血性大肠杆菌 O157 : H7 [J]. 食品科学, 2014, 35(8): 160.
- [49] XU Y G, LI D D, ZHANG B Q, et al. Dual-priming primers-based PCR method for specific detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Science and technology of food industry, 2014, 35(10): 86.
- [50] KIM J K, LEE H J, LEE Y J, et al. Direct detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by a multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide primers [J]. Journal of virological methods, 2008, 149(1): 76.
- [51] 徐义刚, 李丹丹, 刘忠梅, 等. 应用 DPO-PCR 方法特异性检测志贺氏菌[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 28.