

乳制品中常见食源性致病菌检测技术的研究进展

鄢雷娜^{1,2}, 罗跃华², 刘绪平², 许恒毅^{1*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047; 2. 江西省药品检验检测研究院, 南昌 330029)

摘要: 近年来频繁发生的乳与乳制品的质量安全事件引起了人们对乳制品安全的普遍关注, 而食源性致病菌污染是乳制品安全问题的重要隐患之一。乳制品中常见的食源性致病菌有沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌、阪崎肠杆菌、李斯特菌和志贺氏菌等。目前食源性致病菌的检测技术主要有国家标准中的培养法检测技术、分子生物学技术和免疫学技术, 分子生物学技术中的 PCR 检测技术因具有特异性和灵敏度高、简便、快速等优点而得以广泛应用。本文对国家标准中的常规检测技术、分子生物学技术和免疫学技术在乳制品中常见食源性致病菌检测领域的应用进展进行了介绍, 并对其影响因素及存在的问题进行了简要阐述。

关键词: 乳制品; 食源性致病菌; 检测技术; 研究进展

Research progress of detection technology for familiar foodborne pathogenic bacteria in dairy products

YAN Lei-Na^{1,2}, LUO Yao-Hua², LIU Xu-Ping², XU Heng-Yi^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: The frequent quality and safety incidents of milk and dairy products in recent years have caused widespread concern about the safety of dairy products. And foodborne pathogenic bacteria is one of the important hidden trouble of dairy food safety problem. The common foodborne pathogenic bacteria in dairy products are *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* and so on. At present, the detection technologies of foodborne pathogenic bacteria mainly include the methods of culture, molecular biology and immunology, and the PCR detection technology which is a molecular biology technology has a wide range of applications due to its high specificity and sensitivity, simplicity and rapidity. This paper introduced the application progress of conventional national standard detection technologies, molecular biology and immunology technology in dairy products, and their influence factors and existing problems were simply described.

KEY WORDS: dairy products; foodborne pathogenic bacteria; detection technology; research progress

1 引言

近年来, 随着我国经济的持续发展、居民人均收入的

不断提高以及膳食结构的逐步改善, 我国乳与乳制品的消费较过去有了明显增长。国家统计局数据显示^[1], 城镇居民家庭鲜奶人均购买量由 1996 年的 4.6 kg 上升到了 2006

基金项目: 江西省科技计划项目(2014BBG70031)、江西省重点研发计划项目(2016BBG70238)

Fund: Supported by Jiangxi Science and Technology Plan Project (2014BBG70031) and Key Research and Development Project of Jiangxi Province (2016BBG70238)

*通讯作者: 许恒毅, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: kidyxu@163.com

*Corresponding author: XU Heng-Yi, Ph.D, Research Associate, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: kidyxu@163.com

年的 18.3 kg, 从 2007 年开始有所下降, 一直维持在 14 kg 左右, 但近年来频繁发生的乳与乳制品的质量安全事件引起了人们对乳制品安全的普遍关注。

目前, 我国乳制品安全的关注点多集中在婴幼儿配方乳粉和辅助食品上, 婴幼儿乳粉是婴幼儿感染阪崎肠杆菌的最主要渠道, 可引起新生儿脑膜炎、菌血病和坏死性小肠结肠炎, 致死率高达 40%~80%^[2]。虽然普通乳粉消费人群的抵抗力普遍高于婴幼儿, 但其中也不乏有学龄前儿童、孕妇及老人等免疫力较低的人群, 以往也发生过因食用被蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌污染的乳粉导致食物中毒、甚至死亡的食物安全事件^[3,4]。1994 年美国暴发了由沙门氏菌导致的冰淇淋污染, 约有 22400 人患病。2001 年, 在江苏、安徽等地暴发的肠出血性大肠杆菌 O₁₅₇ 食物中毒事件中, 177 人死亡, 中毒人数超过 2 万人。因此, 快速检测与鉴定乳及乳制品中的致病菌是及时有效控制及预防致病菌传播和食物中毒的重要前提。传统国标的细菌学培养方法需经富集培养、选择性分离、形态特征观察、生理生化反应和血清学鉴定等过程, 操作复杂、耗时费力, 而且无法对人工难以培养的致病菌进行检测^[5]。近年来, 微生物检测技术与其相结合, 使得新的微生物快速检测技术得以迅速发展。本文对乳制品中食源性致病菌的检测方法及其研究进展情况进行介绍。

2 乳制品中的常见致病菌及常规检测技术

传统检测方法如 GB 4789.18-2010《乳与乳制品检验》^[6]、GB 4789.4-2010《沙门氏菌检验》^[7]、GB 4789.14-2014

《蜡样芽孢杆菌检验》^[8]和 GB 4789.40-2010《阪崎肠杆菌检验》^[9]等中的检测方法能得到食品样本中致病菌的定性和定量测定结果, 但都需经富集培养、选择性分离、形态特征观察、生理生化反应及血清学鉴定等过程, 操作复杂、耗时费力, 检测过程至少需要 4~7 d, 而且灵敏度低, 容易发生错检和漏检, 无法对人工难以培养的致病菌进行检测。因此, 国家标准中的传统检测方法已无法满足目前乳与乳制品中致病菌的快速检测要求。

3 分子生物学检测技术

分子生物学是 20 世纪发展起来的学科, 近十几年来, 在食源性致病菌的检验检测方面应用最广泛的分子生物学技术是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 原理示意图见图 1。以普通 PCR 技术为基础, 衍生出如多重 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术、基因芯片技术及依赖 PCR 技术的 DNA 指纹图谱技术等。

3.1 常规 PCR 技术

PCR 原理类似于 DNA 的天然复制过程, 其特异性主要依赖于和靶序列两端互补的寡核苷酸引物。首先将 DNA 双链加热变性为单链 DNA, 以单链 DNA 为模板, 加入 2 段人工合成的、与模板 DNA 两端正邻近序列互补的寡核苷酸片断作为引物即上游引物和下游引物, 该对引物与互补的模板单链 DNA 碱基互补结合后, 在有 DNA 聚合酶和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的情况下, 引物沿模板 DNA 链按 5'→3'方向延伸, 自动合成一条新的 DNA 双链, 新合成的

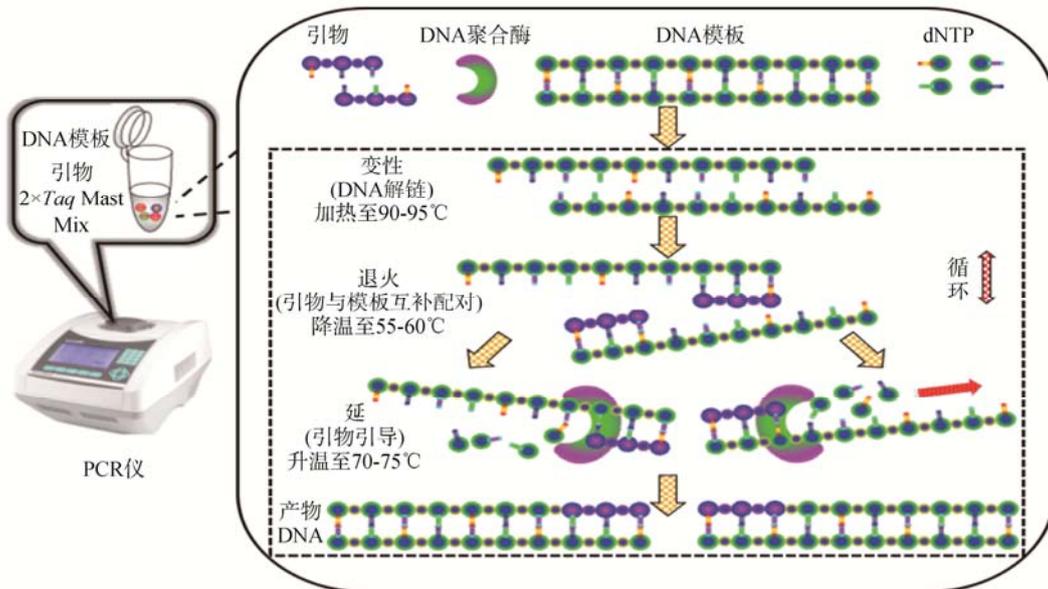


图 1 PCR 原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of PCR

DNA 双链又可成为下次循环的模板^[10]。每完成一个循环需 2~4 min, 2~3 h 就能将目的基因扩增几百万倍。以沙门氏菌的检测技术发展为例, Rahn 等^[11]利用沙门氏菌的 *invA* 设计了一对引物, 第一次用 PCR 方法对沙门氏菌进行了检测。共检测了 630 株沙门氏菌, 约 100 多种血清型和 21 个菌属的 142 株非沙门氏菌, 检出率为 99.4%。

3.2 多重 PCR 技术

多重 PCR 是指在同一反应体系中加入 2 对或 2 对以上特异性引物扩增出多个目的片段的方法。其原理是在模板 DNA、dNTP、适当缓冲液以及特异性引物存在的条件下, 依赖于 DNA 聚合酶的催化, 对多对特异性引物所结合的 DNA 片段进行扩增^[12]。由于多重 PCR 可在同一个反应体系中同时检测多个基因, 节约了检测时间和成本, 是一种既高效又经济的食源性致病菌检测技术。Li 等^[13]根据沙门氏菌的特异性基因 *invA*、*STM4057*、*Hat*、*spy* 和 *sdfl* 建立多重 PCR 方法, 对不同血清型的沙门氏菌进行检测, 结果表明, 所有沙门氏菌均特异性地扩增出了对应的目的片段, 经过磁分离富集处理后, 在检测生肉中的沙门氏菌时能将灵敏度降至 10^2 CFU/g, 有效地缩短了检测时间、节省了成本、提高了检测效率。

3.3 实时荧光定量 PCR 技术

荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR)技术最早在 1992 年由日本的 Higuchi 第一次提出, 而市场化是由美国 Applied Biosystems 公司在 1996 年推出了实时荧光定量 PCR 仪, 实现了 PCR 技术从定性到定量的飞跃^[14]。荧光定量 PCR 技术不需要内标物, 而是在整体体系中加入荧光基团, 利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 过程, 实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度, 并记录到电脑软件中, 通过计算每个样品的 *Ct* 值, 根据标准曲线得出定量结果。荧光定量 PCR 采用了闭管检测方式, 扩增后无须进行电泳, 提升了自动化程度, 减少了污染, 提高了检测的灵敏度和特异性。Wang 等^[15]将荧光定量 PCR 方法与磁珠分离技术结合, 对大肠杆菌 O157:H7 进行检测, 特异性达 100%, 非 O157 抗原的大肠杆菌均没有发生交叉反应。在牛奶样品模拟检测中用磁珠直接从样品中捕获大肠杆菌 O157:H7, 减少了牛奶中抑制剂对 PCR 的影响, 同时省略了样品富集步骤, 缩短了检测时间, 灵敏度达 10^2 CFU/mL。Zhang 等^[16]针对金黄色葡萄球菌建立的荧光定量 PCR 方法, 在实际样品模拟中检测限低至 3×10^2 CFU/g。在 58 株供试参考菌株中, 金黄色葡萄球菌用该方法检测都得到了很好的阳性结果, 其他非目的菌都表现为阴性结果, 表明该方法能快速、准确地检测样品中的金黄色葡萄球菌。

3.4 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由 Notomi 于 2000 年开发的新型核

酸扩增技术, 它针对目的基因的 6 个区域设计了 4 条引物, 利用置换 DNA 聚合酶在等温(60~65 °C)条件下高效、快速、特异地扩增目的基因。袁耀武等^[17]运用 LAMP 技术检测单核细胞增生李斯特氏菌, 检测中以 FTA 滤膜提取的细菌 DNA 作为模板进行扩增, 对 12 株菌进行 LAMP 检测, 结果显示无交叉反应, 灵敏度为 7.3×10^1 CFU/mL, 该方法灵敏度高、特异性好, 不需要复杂昂贵的仪器, 对基层或经济不发达地区具有实际应用意义。

3.5 核酸交联染料结合 PCR 技术

采用 PCR 技术检测乳及乳制品中致病菌的主要缺陷是不能区分活菌和死菌, 从样品中提取的死菌 DNA 同样能作为模板进行特异性扩增, 因此在检测过程中会出现假阳性结果。开发快速、准确的活菌检测技术是食源性致病菌检测领域的一大挑战^[18]。核酸交联染料即含有 2 个或 2 个以上烷基化官能基团的烷基化试剂, 包括叠氮溴化乙锭(EMA)、叠氮溴化丙锭(PMA)、吡咯里西锭类生物碱和苯醌吡啶等^[19,20], 它是一类能够选择性透过死菌的细胞膜, 与 DNA 共价交联, 从而消除死菌 DNA 的扩增信号的物质^[21,22], 利用 PMA/EMA-PCR 技术能消除死菌对 PCR 扩增的影响, 使扩增信号只来源于活菌 DNA, 检测结果与国标方法一致。目前 EMA 和 PMA 在致病菌检测领域具有较好的应用前景。

Li 等^[23]对婴幼儿食品中的阪崎肠杆菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌进行检测时, 用 PMA 处理样品, 由于 PMA 能够透过死菌的细胞膜和 DNA 结合并交联, 形成共价碳氮键, 抑制死菌 DNA 在 PCR 时进行扩增, 提高了检测的准确性, 防止了因存在死菌造成假阳性结果的出现。经过 12 h 富集培养, 检测灵敏度达 10^0 CFU/g。Wang 等^[24]用 PMA 结合 PCR 技术对活的大肠杆菌 O157:H7 进行了检测, 消除死菌的影响后在牛奶样本中上午检测限为 5×10^3 CFU/mL; 王力均等^[25]应用 PMA-qPCR 方法检测了发酵乳制品中的副干酪乳杆菌活菌, 消除了死菌的影响。

4 免疫学技术

1971 年瑞典学者 Engvall 和荷兰学者 Vanweeman 分别提出了酶联免疫技术, 扩大了其应用范围, 使免疫学技术应用到食品安全检测成为可能。免疫学技术的基础是抗原与特定抗体发生特异性结合, 产生凝聚或者沉淀反应, 即以准备好的特异性抗原(抗体)作为试剂, 检测待测标本(样品)中的相应抗体(抗原)。由于抗原抗体结合的高度敏感性和特异性, 且抗原(抗体)量与其反应强度呈明显的函数关系, 可以对样品进行定性或定量分析, 主要包括酶联免疫吸附、酶联荧光技术、免疫胶体金技术和免疫磁珠技术等。

4.1 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术(enzyme-linked immunosorbent

assay, ELISA)的原理为: 抗原或抗体与酶以交联剂结合为酶标抗原或抗体, 并与固相载体上或组织内相应的抗原抗体发生特异反应, 牢固地形成保持活性的免疫复合物, 当加入相应底物时, 底物被酶催化呈现出相应的颜色, 而且颜色深浅与相应抗原抗体的含量成正比。其结合了免疫荧光法与放射免疫法的优点, 具有高特异性和高灵敏度, 操作简便、适用范围广, 且检测速度快, 能够同时进行大量样品的检测^[26]。

王丹等^[27]首先根据目的基因设计特异性引物和特异性探针, 再用链霉亲和素包被酶标板, PCR 扩增后, 通过一定方法解链, 与探针杂交, 然后利用生物素与亲和素的高亲和力将杂交产物与酶标板连接, 形成酶标板-生物素-亲和素-探针-PCR 产物-地高辛-抗地高辛抗体-酶的复合物, 最后加入酶的相应底物进行显色, 使得体系的特异性增强, 从而有效避免假阳性与假阴性的干扰。这项技术对大肠杆菌 O157:H7 的检出限低至 0.04 CFU/mL, 灵敏度较高。Li 等^[28]利用 2 种特异性基因设计引物, 利用不同 PCR 确定循环数与检出限, 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 10^3 CFU/mL (传统 PCR 技术的检出限为 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 技术比传统 PCR 技术的灵敏度高 10~100 倍, 酶标仪结果客观、主观干扰小, 且无需在 PCR 扩增后对 DNA 产物进行电泳检测^[29]。此外, ELISA 技术还具有操作简单、特异性强等优点, 现已应用于多种食源性致病菌检测领域^[30]。但 PCR-ELISA 技术也有操作周期较长, 无法同时检测多种食源性致病菌的缺点^[31]。

4.2 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB)分离技术是特异性抗体偶联在免疫磁珠表面, 待测样品与磁珠发生特异性结合, 经过磁场作用后, 复合物被滞留, 搭载抗原抗体的磁珠与其他成分分离, 使致病菌得到不断分离和浓缩。

Favrin 等^[32]使用免疫磁珠分离-噬菌体检测脱脂乳、牛肉中的沙门氏菌和大肠杆菌 O157:H7, 结果表明, 该方法在食源性致病菌检测领域具有高特异性和高效快速的优点。该方法主要应用于牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的检测和食品中单增李氏杆菌和副溶血性弧菌的检测。

5 结 语

在乳制品检测中, 传统的国标检测方法(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。随着分子生物学和免疫学的发展, PCR 技术和免疫学技术及其衍生的一系列技术已广泛运用于国内外乳与乳制品的快速检测。但 PCR 技术也有易产生假阳性和假阴性的缺点, PMA-mPCR 方法可以在死菌存在的条件下只

检测乳与乳制品中活的致病菌, 避免了“假阳性”结果的出现。免疫学中的 ELISA 技术与传统检测方法相比, 具有快速、准确、操作简单, 且能同时检测大量样本等优点, 但该技术影响因素较多, 抗体对其灵敏度、准确度的影响尤为重要, 结构类似物也会引起不同程度的交叉反应, 在未来应用中对提高灵敏度、降低各因素影响、标准化规范操作规程等方面有待进一步探索。总之, 随着科技的不断发展, 乳与乳制品中致病菌的检测灵敏度、特异性、准确性、便捷性和及时性等方面将得到不断的发展和改善。

参考文献

- [1] 张亚红, 王婷. 预测微生物学在乳及乳制品中的应用[J]. 检验检疫学刊, 2015, 25(6): 62-65.
Zhang YH, Wang P. Application of predictive microbiology in dairy products [J]. J Inspect Quarant, 2015, 25(6): 62-65.
- [2] 周少君. 2010 年-2013 年广东省婴幼儿食品中阪崎肠杆菌污染情况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(15): 2248-2251.
Zhou SJ. Survey of *Enterobacter sakazakii* pollution in infant food in Guangdong province in 2012-2013 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(15): 2248-2251.
- [3] 刘世庆, 刘亚男. 污染奶粉引起食物中毒的调查报告(摘要)[J]. 中国公共卫生, 1986, 5(2): 17.
Liu SQ, Liu YN. Survey of the contaminated milk powder caused by food poisoning [J]. Chin J Public Health, 1986, 5(2): 17.
- [4] 萨日娜. 一起由金黄色葡萄球菌引起的奶粉食物中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 636-636.
Sa RN. A poisoning with milk powder food caused by *staphylococcus aureus* [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(5): 636-636.
- [5] 苏世彦, 庄平, 陈忘名. 食品微生物检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
Su SY, Zhuang P, Chen WM. Food microorganism inspection manual [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998.
- [6] GB4789.18-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳与乳制品检验[S].
GB4789.18-2010 National food safety standard-Food microbiological examination-Milk and milk products [S].
- [7] GB 4789.4-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination *Salmonella* [S].
- [8] GB 4789.14-2014 食品安全国家标准食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验[S].
GB4789.14-2014 National food safety standard-Food microbiological examination *Bacillus cereus* [S].
- [9] GB 4789.40-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 阪崎肠杆菌检验[S].
GB4789.40-2010 National food safety standard-Food microbiological examination *Enterobacter sakazakii* [S].
- [10] 栗建永, 赵琢, 贾晓川, 等. 食源性致病菌检测分析技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(18): 110-115.
Li JY, Zhou Z, Jia XC, et al. Advance on detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Res Dev, 2013, 34(18): 110-115.

- [11] Rahn K, De Grandis SA, *et al.* Amplification of an inva gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. *Mol Cell Probes*, 1992, 6(4): 271–279.
- [12] 李凡, 许恒毅, 李福来. 多重 PCR 技术在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2015, 21: 372–375.
Li F, Xu HY, Li FL. Application of multiplex polymerase chain reaction in detection of foodborne pathogens [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 21: 372–375.
- [13] Li F, Li F, Chen B, *et al.* Sextuplex PCR combined with immunomagnetic separation and PMA treatment for rapid detection and specific identification of viable *Salmonella* spp, *Salmonella enterica* serovars Paratyphi B, *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Enteritidis* in raw meat [J]. *Food Control*, 2016, 9: 9.
- [14] 张蓓. 实时荧光定量 PCR 的研究进展及其应用[J]. *国外医学-临床生物化学与检测学分册*, 2003, 24(6): 327–329.
Zhang P. Application of real-time fluorescent quantitative RT-PCR [J]. *Foreign Med-Clini Biochem Test Booklet*, 2003, 24(6): 327–329.
- [15] Wang L, Li P, Zhang Z, *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): 119–125.
- [16] Zhang Z, Liu W, Xu H, *et al.* Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(3): 1625–1633.
- [17] 袁耀武, 张亚爽, 马晓燕, 等. LAMP 检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(3): 168–172.
Yuan YW, Zhang YS, Ma XY, *et al.* The study on the detection of *Listeria Monocytogenes* by LAMP [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2009, 9(3): 168–172.
- [18] 黄楚楚, 张志鸿, 余双, 等. 核酸交联剂在食源致病菌活菌检测中应用的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(9): 3435–3440.
Huang CC, Zhang ZH, Yu S, *et al.* Application of nucleic acid cross-linking agent on detecting viable foodborne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(9): 3435–3440.
- [19] Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? [J]. *Nutr Rev*, 2010, 68(5): 257–269.
- [20] Rajski SR, Williams RM. DNA cross-linking agents as antitumor drugs [J]. *Chem Rev*, 1998, 98(8): 2723–2796.
- [21] Tourlousse DM, Ahmad F, Stedtfeld RD, *et al.* A polymer microfluidicchip for quantitative detection of multiple water-and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biomed Microdevices*, 2012, 14(4): 769–778.
- [22] Bae S, Wuertz S. Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9): 2940–2944.
- [23] Li F, Xie G, Zhou B, *et al.* Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2016, 74: 176–182.
- [24] Wang L, Li P, Yang Y, *et al.* Development of an immunomagnetic separation–propidium monoazide-polymerase chain reaction assay with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk [J]. *Int Dairy J*, 2014, 34(2): 280–286.
- [25] 王力均, 谭强来, 朱江, 等. 应用 PMA-qPCR 方法快速准确检测发酵乳制品中副干酪乳杆菌活菌的研究[J]. *中国微生态学*, 2013, 25(1): 1–4.
Wang LJ, Tan QL, Zhu J, *et al.* Development of PMA-qPCR assay for rapid and accurate detection of viable *Lactobacillus paracasei* in fermented dairy products [J]. *Chin J Microecol*, 2013, 25(1): 1–4.
- [26] Zhao ZJ, Liu XM. Preparation of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay specific for *Escherichia coli* O157 in foods [J]. *Biomed Environ Sci*, 2005, 18: 254–259.
- [27] 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): 128–131.
Wang D, Liu JH, Shi YY, *et al.* Specific and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 by PCR-ELISA [J]. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2014, (6): 128–131.
- [28] Li YH, Cao L, Zhang C, *et al.* Development and evaluation of a PCR-ELISA assay for the detection and quantification of *Cronobacter spp* [J]. *Int Dairy J*, 2013, 33(1): 27.
- [29] 谭炳乾, 何启盖, 肖军, 等. 建立 PCR-ELISA 方法检测单核细胞增生性李斯特菌[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(4): 670.
Tan BQ, He QG, Xiao J, *et al.* Development of PCR-ELISA for identification of *Listeria Monocytogenes* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2008, 16(4): 670.
- [30] 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]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 113(3): 284.
- [31] 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.
Shi YY, Liu JH, Xue LG, *et al.* Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in foods by PCR-ELISA [J]. *Food Sci*, 2013, 34(10): 246.
- [32] Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, (85): 63–71.

(责任编辑: 刘 丹)

作者简介



鄢雷娜, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与检测。
E-mail: ylnrains@126.com



许恒毅, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: kidyxu@163.com