

# 运用实时荧光 PCR 法辅助鉴定能力验证 样品中的沙门氏菌

汪 华\*, 李俊岐, 常怡虹

(衡阳市食品药品检验检测中心, 衡阳 421000)

**摘 要:** **目的** 运用实时荧光 PCR 法辅助鉴定能力验证样品中的沙门氏菌, 以提高检验准确度。**方法** 采用传统的增菌、选择性培养、生化鉴定方法进行样品检验, 实时荧光 PCR 法作为辅助手段对 BPW 增菌液及可疑菌落进行扩增, 最后用 API20E 鉴定系统对可疑菌落进行确认。**结果** 3 个样品经增菌、选择性培养、生化鉴定后均无显著符合沙门氏菌菌落特征及生化特征的可疑菌落; 缓冲蛋白胨水增菌液实时荧光 PCR 法扩增结果表明样品 S02 为可疑样品, 其分离得到的菌落 S02-4 有典型扩增曲线; 经 API20E 鉴定系统确认, 样品 S02 为阳性样品, 阳性菌为猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种。**结论** 实时荧光 PCR 法操作简单, 准确度高, 可作为传统检验方法的有效补充。

**关键词:** 实时荧光 PCR; 沙门氏菌; 能力验证

## Aided identification of *Salmonella* in the samples of proficiency testing by real-time fluorescent PCR

WANG Hua\*, LI Jun-Qi, CHANG Yi-Hong

(Hengyang food and drug inspection and Testing Center, Hengyang 421000, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To improve test accuracy of assist identification of *Salmonella* in proficiency test samples by real-time fluorescent PCR. **Methods** The samples were tested by traditional methods of enrichment, selective culture and biochemical identification. The real-time fluorescent PCR was used to amplify BPW enrichment solution and suspicious colonies as an assistant method. Finally, suspicious colonies were identified by API20E identification system. **Results** After bacteria enrichment, selective culture and biochemical identification, none of the 3 samples were found to be significantly consistent with the characteristics of *Salmonella* colonies and the biochemical characteristics of suspicious colonies. Real-time fluorescent PCR amplification with buffered peptone water enrichment solution showed that sample S02 was suspicious and the colony S02-4 isolated from the sample S02 had typical amplification curve. Finally the API20E identification system confirmed that the sample S02 was positive and the suspicious bacteria were *Salmonella cholerae subspecies Arizona*. **Conclusions** The real-time PCR is simple to operate with high accuracy and can be used as an effective complement to the traditional testing methods.

**KEY WORDS:** real-time PCR; *Salmonella*; proficiency testing

\*通讯作者: 汪华, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。E-mail: fanye001@126.com

\*Corresponding author: WANG Hua, Engineer, Hengyang Food and Drug Inspection and Testing Center, No.33, Furong Road, Huaxin District, Hengyang 421000, China. E-Mail: fanye001@126.com

## 1 引言

沙门氏菌有鞭毛、无荚膜,属于兼性厌氧革兰氏阴性肠杆菌;其种类繁多,自1885年细菌学家 Salmon 和 Smith 分离得到猪霍乱沙门氏菌以来,已经有近 3000 种沙门氏菌被发现。沙门氏菌是一种人畜共患病原菌<sup>[1]</sup>,能引起恶心、呕吐、腹泻、发热、乏力等症状,严重可导致脱水、休克及意识障碍<sup>[2]</sup>。世界卫生组织将沙门氏菌列入具有严重危害和中等危害的食物传播性病原菌。据统计,我国细菌性食物中毒事件有 70%~80%是由沙门氏菌引起的;在世界范围内,沙门氏菌也是细菌性中毒事件的首要原因<sup>[3]</sup>。可见,沙门氏菌检验在食品安全中具有重要意义。我国各类食品安全国家标准中均规定不得检出沙门氏菌。

实验室能力验证是指是利用实验室间比对来确定实验室和检查机构从事特定测试活动的技术能力的活动。为加强实验室对病原菌的检测和鉴定水平,提升业务能力,本实验室参加了由中检院组织的 NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验的能力验证。经增菌、选择性培养、生化鉴定等传统方法对能力验证提供的 3 个样品进行检验,未得到显著符合沙门氏菌菌落特征及生化特征的可疑菌落。实时荧光 PCR 法是以核酸为靶标,检验结果不受生化特征影响,准确度高、检验周期短,是快速筛查及诊断的有效手段<sup>[4]</sup>。为确保检验结果准确,本研究在传统方法检验基础上,采用实时荧光 PCR 法对能力验证的样品增菌液及选择性平板上生长的菌落进行扩增,为确定阳性菌提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品来源

编号为 NIFDC-PT-135 巧克力中沙门氏菌检验的能力验证样品由中国食品药品检定研究院提供,共 3 份,每份含巧克力 10 g,分别记为 S01、S02、S03。

### 2.2 试剂与仪器

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(selenite cystine broth, SC)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(sodium tetrathiosulfonate, TTB)、沙门氏菌生化鉴定试剂盒(广东环凯生物科技有限公司);亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)培养基(美国 BD 公司);科玛嘉沙门氏菌显色培养基(上海欣申生物科技有限公司);API20E 生化鉴定试剂条(法国生物梅里埃公司);实时荧光定量 PCR 法沙门氏菌核酸检测试剂盒(货号:YR02001,北京陆桥技术股份有限公司);沙门氏菌多价诊断血清(宁波天润生物药业有限公司)。

鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、大肠埃希氏菌 ATCC8099(广东环凯生物科技有限公司)。

7500fast 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品增菌、分离培养及生化鉴定

在生物安全柜内打开样品瓶,用 20 mL 保温至 45 °C 的无菌 BPW 增菌液将样品融化,然后转移至无菌均质袋内。再润洗样品瓶 2 次,每次 20 mL BPW 增菌液。最后再添加 30 mL 增菌液至均质袋内,制成 1:10(V/V)的样品匀液。然后按照 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》<sup>[5]</sup>的步骤检验。

#### 2.3.2 实时荧光 PCR 实验

取 1 mL 菌液( $\sim 10^9$  CFU)于 1.5 mL 离心管,10000g 离心 2 min,去上清液;加 200  $\mu$ L 裂解液,涡旋混匀;平板培养物则直接挑取至裂解液中。沸水浴裂解 10 min,冰浴冷却后 10000g 离心 2 min,取上清液即为模板。

每管中加入 22.6  $\mu$ L PCR 反应液及 0.4  $\mu$ L Taq 酶,再加入 2  $\mu$ L 模板,空白对照加 2  $\mu$ L 无菌超纯水,阴性对照为 2  $\mu$ L 大肠埃希氏菌 DNA,阳性对照为鼠伤寒沙门氏菌 DNA。加样完成后,上下颠倒数次,混匀,然后快速短时离心,使整个体系均匀于 PCR 管底部。扩增反应为:95 °C, 3 min 预变性,以 95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s 作为一个循环,设置 35 个循环。选择 FAM 荧光通道。判定方法:阳性对照有典型扩增,阴性对照无扩增,样品有扩增,且:  $C_t < 35$  为阳性结果,  $35 < C_t < 40$  为可疑结果,  $C_t > 40$  为阴性结果。

#### 2.3.3 API20E 生化鉴定

挑取经过纯化后的培养物至 5 mL 无菌生理盐水中,制成约 0.5 麦氏浊度的菌悬液( $\sim 10^8$  CFU/mL)。按 API20E 生化鉴定试剂条操作说明书要求将菌悬液加入各培养孔中,按要求培养。然后依据生化培养结果查询微生物种属信息。

#### 2.3.4 血清学实验

##### 1) 自凝性检查

取一块洁净玻璃片,滴加一滴生理盐水;然后用接种环取纯化培养物于生理盐水中,混匀。将玻片轻轻摇动 30~60 s,在黑色背景下观察反应;若出现可见的菌体凝集,即认为有自凝性,反之无自凝性。若无自凝现象,则进行血清学鉴定。

##### 2) 多价菌体抗原(O)鉴定

在玻片上划出 2 个约 1 cm $\times$ 2 cm 的区域,挑取 1 环待测菌,各放 1/2 环于玻片上的每一区域上部,在其中一个区域下部加 1 滴多价菌体(O)抗血清,在另一区域下部加入 1 滴生理盐水,作为对照。再用无菌的接种环分别将两个区域内的菌苔研成悬液。将玻片倾斜摇动混合 1 min,并对着黑暗背景进行观察,任何程度的凝集现象皆为阳性反应。

##### 3) 多价鞭毛抗原(H)鉴定

操作同 2) H 抗原发育不良时,将菌株接种在 0.55%~0.65%半固体琼脂平板的中央,待菌落蔓延生长时,在其边缘取菌检查。

3 结果与分析

3.1 增菌液荧光 PCR 实验

取 BPW 增菌培养液 1 mL, 转接至 200 mL BPW 增菌液, 36 ℃、培养 24 h。取二次 BPW 增菌液按 2.3.2 步骤进行荧光 PCR 扩增实验, 结果见图 1。从扩增曲线来看, 阳性对照有显著扩增, 阴性对照无扩增; 3 个样品中, 样品 S01 与样品 S03 无扩增; 样品 S02 有扩增,  $C_t$  为 23.6。综合实验结果, 样品 S02 疑似含有沙门氏菌。

3.2 分离培养与生化鉴定

样品经 BPW 增菌培养后, 接种至 TTB 和 SC 培养液进行二次增菌, 然后分别划线接种于 BS 和显色培养基平板, 培养结果见表 1。3 个样品在 BS 平板长出透明及棕黑色菌落, 但周围培养基未变色; 在沙门氏菌显色培养基上长出浅桃红色及蓝色菌落, 无淡紫色菌落。挑取 BS 平板上

的棕黑色菌落和显色平板上的浅桃红色、蓝色菌落进一步划线、纯化, 然后生化鉴定, 结果见表 2。

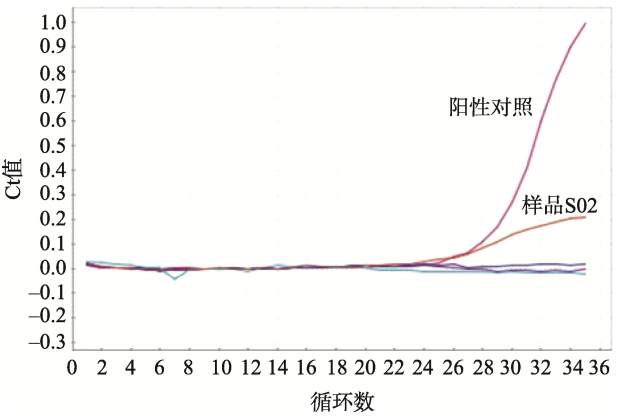


图 1 样品增菌液实时荧光 PCR 实验结果  
Fig.1 Real-time fluorescent PCR test of sample enrichment solution

表 1 样品增菌及选择性平板培养结果  
Table 1 Results of sample inoculation and selective plate culture

| 样品编号 | BPW | TTB | SC    | BS 平板                | 显色平板         |
|------|-----|-----|-------|----------------------|--------------|
| S01  | 浑浊  | 浑浊  | 浑浊、变红 | 透明菌落, 棕黑色菌落          | 浅桃红色菌落, 蓝色菌落 |
| S02  | 浑浊  | 浑浊  | 浑浊、变红 | 透明菌落, 棕黑色菌落          | 浅桃红色菌落, 蓝色菌落 |
| S03  | 浑浊  | 浑浊  | 浑浊、变红 | 透明菌落, 棕黑色菌落          | 浅桃红色菌落, 蓝色菌落 |
| 空白对照 | 澄清  | 澄清  | 澄清    | 无菌落生长                | 无菌落生长        |
| 阳性对照 | 浑浊  | 浑浊  | 浑浊、变红 | 棕黑色菌落、有金属光泽、周围培养基变棕色 | 淡紫色菌落        |

注: 显色说明: 淡紫色, 沙门氏菌; 蓝色, 大肠杆菌、大肠菌群以及乳糖阳性沙门氏菌; 无色, 变形杆菌

表 2 可疑菌落生化鉴定结果  
Table 2 Biochemical identification of suspicious bacteria

| 菌落编号  | 菌落特征 | 斜面 | 底部 | 产气 | H <sub>2</sub> S | 赖氨酸脱羧酶 | 胨基质 | 尿素 | KCN | ONPG | 山梨醇 | 甘露醇 |
|-------|------|----|----|----|------------------|--------|-----|----|-----|------|-----|-----|
| S01-1 | 棕黑   | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S01-2 | 棕黑   | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S01-3 | 浅红   | K  | A  | +  | -                | -      | +   | +  | +   | -    | -   | -   |
| S01-4 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S01-5 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S02-1 | 棕黑   | K  | A  | +  | -                | +      | -   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S02-2 | 棕黑   | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S02-3 | 浅红   | K  | A  | +  | -                | -      | +   | +  | +   | -    | -   | -   |
| S02-4 | 蓝    | K  | A  | +  | -                | +      | -   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S02-5 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S03-1 | 棕黑   | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S03-2 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S03-3 | 浅红   | k  | A  | +  | +                | -      | -   | +  | +   | -    | -   | -   |
| S03-4 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| S03-5 | 蓝    | A  | A  | +  | -                | +      | +   | -  | -   | +    | +   | +   |
| 阳性对照  | 浅紫   | K  | A  | +  | +                | +      | -   | -  | -   | -    | +   | +   |

经生化鉴定, 3 个样品的可疑菌落均不完全符合沙门氏菌生化反应特征。其中, 3 个样品的浅桃红色菌落有多项生化指标不符。样品 1、样品 3 各自的蓝色菌落与棕黑色菌落生化反应结果一致, 不产  $H_2S$ 、且靛基质反应呈阳性。样品 2 中: 菌落 S02-2 与 S02-5 不产  $H_2S$ 、靛基质反应呈阳性; 菌落 S02-1 与 S02-4 不产  $H_2S$ , ONPG 呈阳性。

3.3 可疑菌落实时荧光 PCR 实验与 API20E 鉴定

挑取 S01-4、S02-3、S02-4、S03-4 4 个菌落按 2.3.2 步骤进行荧光 PCR 鉴定实验, 结果见图 2。从结果来看, S02-4 有明显扩增,  $C_t$  为 25.2, 其他 3 个菌落无扩增, 这与增菌液扩增结果一致。菌落扩增较菌液扩增  $C_t$  值增大可能是因菌体裂解不充分、模板量相对较少所致。

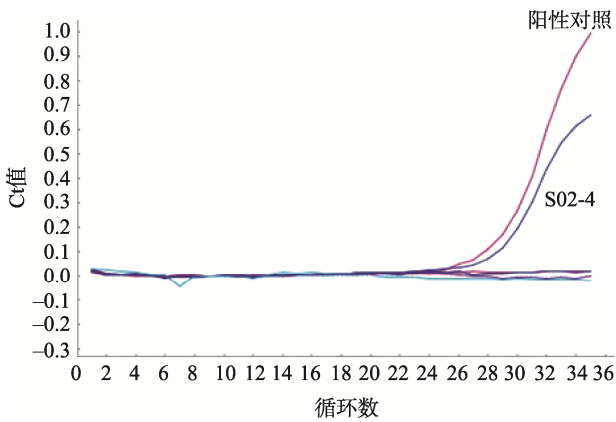


图 2 可疑菌落实时荧光 PCR 实验结果  
Fig.2 Real-time fluorescent PCR test of suspicious bacteria

挑取上述 4 个菌落按 2.3.3 步骤做 API20E 生化鉴定, 结果见表 3。

经 API20E 生化鉴定, S02-4 为猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种, 置信度为 93.6%, 不产  $H_2S$ ; 经血清学鉴定, 与多价抗原 OME、HMC 凝集; 其他菌落鉴定为大肠埃希氏菌。

3.4 2 种方法检验结果对比

本次能力验证的 3 个样品在选择性平板上均无显著沙门氏菌菌落特征, 可疑菌落不产  $H_2S$ 、ONPG 反应结果呈阳性等生化特征与典型沙门氏菌生化特征不一致, 增加了检验结果的不确定性。运用实时荧光 PCR 法对增菌液、可疑菌落进行扩增实验, 筛选出可疑菌落, 最终经 API20E

鉴定系统确认为猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种; 如表 4 所示。沙门氏菌种类繁多, 某些特殊菌株的生化特征与标准菌株不一致, 易当作非沙门氏菌处理。在本次能力验证中, 运用实时荧光 PCR 法在菌落特征与生化特征均不显著的菌落中筛选出可疑菌落, 提供新证据以提升检验准确度, 是传统检验方法的有效补充<sup>[6]</sup>。

表 3 可疑菌落的 API20E 生化鉴定结果  
Table 3 Biochemical identification of suspicious bacteria by API20E

| 实验项目   | S01-4          | S02-4                 | S03-4          | 阳性对照         |
|--------|----------------|-----------------------|----------------|--------------|
| ONPG   | +              | +                     | +              | -            |
| ADH    | -              | +                     | -              | +            |
| LDC    | +              | +                     | +              | +            |
| ODC    | +              | +                     | +              | +            |
| CIT    | -              | +                     | -              | +            |
| $H_2S$ | -              | -                     | -              | +            |
| URE    | -              | -                     | -              | -            |
| TDA    | -              | -                     | -              | -            |
| IND    | +              | -                     | +              | -            |
| VP     | -              | -                     | -              | -            |
| GEL    | -              | -                     | -              | -            |
| GLU    | +              | +                     | +              | +            |
| MAN    | +              | +                     | +              | +            |
| INO    | -              | -                     | -              | +            |
| SOR    | +              | +                     | +              | +            |
| RHA    | +              | +                     | +              | +            |
| SAC    | -              | -                     | -              | -            |
| MEL    | +              | +                     | +              | +            |
| AMY    | -              | -                     | -              | -            |
| ARA    | +              | +                     | +              | +            |
| 鉴定结果   | 大肠埃希氏菌 (99.9%) | 猪霍乱沙门氏菌亚利桑那亚种 (93.6%) | 大肠埃希氏菌 (99.9%) | 沙门氏菌 (99.9%) |

表 4 2 种方法检验结果对比  
Table 4 Comparison of the results of two methods

| 检验阶段       | BPW 增菌液   | 选择性培养 | 可疑菌落生化鉴定    | API20E 确认 |
|------------|-----------|-------|-------------|-----------|
| 传统方法       | —         | 无可疑菌落 | 无阳性菌落       | 阳性        |
| 实时荧光 PCR 法 | S02 为可疑样品 | —     | S02-4 为阳性菌落 | 阳性        |

挑取了生化反应各异的菌落进行实时荧光 PCR 鉴定,其中 S02-4 有明显扩增,其他均无扩增,较好地区分目标菌与非目标菌。荧光 PCR 法以核酸为靶标,通过观察预先设计的引物及探针与目标核酸序列是否特异性结合而确定目标微生物,有较高的特异性与可靠性<sup>[7]</sup>。

## 4 结论与讨论

自 20 世纪 80 年代以来,PCR 技术经过长期发展已发展出荧光 PCR、多重 PCR、数字 PCR 等多种技术形式,而实时荧光 PCR 因其操作简单易用、高通量、过程可直接监测等特点成为快速筛查<sup>[8]</sup>和分子诊断<sup>[9]</sup>的重要技术手段,在致病菌<sup>[10]</sup>、转基因<sup>[11]</sup>、过敏源<sup>[12]</sup>、食品源性<sup>[13]</sup>、疾病筛查<sup>[14]</sup>等领域的检验有广泛研究与应用。目前,荧光 PCR 法用于沙门氏菌检验的研究越来越深入。黄静玮等<sup>[15]</sup>分析总结了沙门氏菌基因组、鞭毛蛋白、外膜蛋白以及毒力岛等的基因序列,筛选种特异性基因以建立特异性检测方法,实现对沙门氏菌菌种的快速诊断、流行病学调查以及监测控制。其中属特异性基因包括 *inv*、*hut*、*hns*、*spv*、*fim*、*hilA*、16S rDNA 等;血清群特异性基因主要为 *rfb*,血清型特异性基因包括 *fliC*、*fliB*、*via* 等,*fliC* 可作为甲型副伤寒沙门氏菌特异性检测基因。王青龙等<sup>[16]</sup>针对 *gudD* 基因设计引物及探针,成功区分亚利桑那沙门氏菌与其他沙门氏菌,检测灵敏度可达到 1~10 CFU/mL 的添加浓度。

本次能力验证中,实时荧光 PCR 法成功筛选出可疑样品及菌落,确定了阳性样品,帮助能力验证取得了满意结果,为日常实验室的检测工作提供参考。

## 参考文献

- [1] 沈学怀, 张丹俊, 潘孝成, 等. 安徽地区禽源沙门氏菌分离鉴定与耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(12): 3663–3669.  
Shen XH, Zhang DJ, Pan XC, *et al.* Isolation, identification and drug resistance of *Salmonella* from poultry in Anhui [J]. Chin J Veter Med, 2017, 44(12): 3663–3669.
- [2] 王学硕, 崔生辉, 邢书霞, 等. 餐饮食品中沙门氏菌的危害分析、污染调查与防控[J]. 中国药事, 2013, 27(9): 974–979.  
Wang XS, Cui SH, Xing SX, *et al.* Hazard analysis, pollution investigation and control of *Salmonella* in food and beverage [J]. Chin Pharm Aff, 2013, 27(9): 974–979.
- [3] 尹德凤, 张莉, 张大文, 等. 食品中沙门氏菌污染研究现状[J]. 江西农业学报, 2015, 27(11): 55–60.  
Yin DF, Zhang L, Zhang DW, *et al.* Research status of *Salmonella* contamination in food [J]. Acta Agric Jiangxi, 2015, 27(11): 55–60.
- [4] 向雪菲, 刘斌, 张利达, 等. 食品中沙门氏菌分子检测靶点的筛选与评价[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 941–946.  
Xiang XF, Liu B, Zhang LD, *et al.* Screening and evaluation of molecular detection targets for *Salmonella* in food [J]. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(7): 941–946.
- [5] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].  
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiological

examination *Salmonella* [S].

- [6] 白亚龙, 索玉娟, 周昌艳. 食源性致病菌 PCR 检测前处理方法研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 191–196.  
Bai YL, Suo YJ, Zhou CY. A review of the development in pretreatment methods for PCR detection of food-borne pathogens [J]. Food Mach, 2017, 33(12): 191–196.
- [7] 王惠, 钱冲, 郭峰, 等. 实时定量 PCR 检测技术研究进展[J]. 种子, 2013, 32(6): 43–47.  
Wang H, Qian C, Guo F, *et al.* Research progress of real time quantitative PCR technique [J]. Seed, 2013, 32(6): 43–47.
- [8] Otacilio CM, Zaida E, Yadonb EC. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives [J]. Acta Trop, 2018, (184): 29–37.
- [9] 叶鹏. 全自动实时荧光定量 PCR 系统在肺结核诊断和药敏试验检测中的应用价值[J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(4): 307–310.  
Ye P. Application value of fully automatic real-time fluorescence quantitative PCR System in diagnosis and drug Sensitivity test of pulmonary tuberculosis [J]. Chin Prev Med, 2017, 18(4): 307–310.
- [10] Gerhard S, Sandra T, Sven R, *et al.* Detection of five potentially periodontal pathogenic bacteria in peri-implant disease: A comparison of PCR and real-time PCR [J]. Diagn Micr Infec Dis, 2016, 85(3): 289–294.
- [11] Fu LZ, Bei N, Li JC, *et al.* A new construct specific real-time PCR method for screening GMO ingredients with *gat-tpinII* cassette in foods, feeds and seeds [J]. Food Control, 2018, (86): 266–274.
- [12] 王玮, 韩建勋, 吴亚君, 等. 芥末等 8 种食物过敏原的多重 PCR 检测技术[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 156–159.  
Wang W, Han JX, Wu YG, *et al.* Detection of Mustard and other 8 kinds of food allergen by multiplex PCR [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(6): 156–159.
- [13] 韩建勋, 黄文胜, 吴亚君, 等. 果汁中梨成分分子生物学鉴别-实时荧光 PCR 方法研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 207–212.  
Hang JX, Huang WS, Wu YJ, *et al.* Molecular biological identification of pear components in fruit juice by real-time fluorescent PCR [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2010, 10(1): 207–212.
- [14] Luca G, Marcello C, Aurora D, *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis [J]. Parasit Vect, 2018, 11(273): 1–13.
- [15] 黄静玮, 汪铭书, 程安春. 沙门氏菌分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 649–652.  
Huang JW, Wang MS, Cheng AC. Advances in molecular biology of *Salmonella* [J]. Chin J Zoon, 2011, 27(7): 649–652.
- [16] 王青龙, 蔡雪凤, 周艳霞, 等. 实时荧光 PCR 法检测食品中亚利桑那沙门氏菌[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 179–182.  
Wang QL, Cai XF, Zhou YX, *et al.* Detection of *Salmonella arizonae* in food by real-time PCR [J]. China Brew, 2018, 37(6): 179–182.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



汪 华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。  
E-mail: fanye001@126.com