

预包装柳州螺蛳粉沙门氏菌实时荧光 PCR 快速检测

谢雨龙*, 覃巧思, 罗璐, 韦维, 韦永朴

(柳州市食品药品检验所, 柳州 545500)

摘要: 目的 建立实时荧光 PCR 法快速检测预包装柳州螺蛳粉中沙门氏菌的分析方法。**方法** 根据沙门氏菌 *invA* 基因设计引物和探针, 优化反应体系中的探针浓度后对人工添加沙门氏菌和干扰菌模拟受污染的预包装柳州螺蛳粉样品进行检测。**结果** 设计的引物和探针只对阳性菌株有荧光反应, 具有良好的特异性, 最佳反应探针终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 检测灵敏度为 100 CFU/mL, 扩增效率 103.92%; 对模拟污染的预包装柳州螺蛳粉经过一步增菌 18 h 后最低能检测出 4 CFU/25 g 沙门氏菌。**结论** 实时荧光 PCR 检测灵敏度高、特异性强, 可应用于预包装柳州螺蛳粉中沙门氏菌的快速高效检测。

关键词: 预包装柳州螺蛳粉; 沙门氏菌; 实时荧光 PCR

Rapid detection of *Salmonella* in prepackaged Liuzhou river snail rice noodles by real-time PCR

XIE Yu-Long*, QIN Qiao-Si, LUO Lu, WEI Wei, WEI Yong-Pu

(Liuzhou Institute for Food and Drug Control, Liuzhou 545500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of *Salmonella* in pre-packaged liuzhou snail meal by real-time PCR. **Methods** Primers and probes were designed according to the *invA* gene of *Salmonella*, and the concentration of the probes in the reaction system was optimized to detect the artificially added samples of contaminated pre-packaged Liuzhou snail meal with *Salmonella* and interfering bacteria. **Results** The primers and probes designed only had fluorescence response to the positive strain and had good specificity, the final concentration of the probe for the optimal reaction was 0.2 $\mu\text{mol/L}$ and the achieved 100 CFU/mL detection sensitively and 103.92% amplification efficiently. The detection limit of the samples previously mentioned was 4 CFU/25 g (*Salmonella*) after one-shot bacterial proliferation with 18 h. **Conclusion** The real-time PCR with high sensitivity and specificity can be widely applied to detect the *Salmonella* in prepackaged Liuzhou river snail rice noodles effectively and rapidly.

KEY WORDS: prepackaged Liuzhou river snail rice noodles; *Salmonella*; real-time PCR

基金项目: 柳州市重点研发计划(2018BK10505)

Fund: Supported by Key Research and Development Project of Liuzhou City (2018BK10505)

*通讯作者: 谢雨龙, 工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检测。E-mail: xyulong0523@163.com

*Corresponding author: XIE Yu-Long, Engineer, Liuzhou Institute for Food and Drug Control, Yang He industrial new district, Liuzhou 545500, China. E-mail: xyulong0523@163.com

1 引言

预包装柳州螺蛳粉是柳州市近几年生产的一款网红产品,目前执行地方标准 DBS 45/034-2018《食品安全地方标准 柳州螺蛳粉》^[1],虽然预包装螺蛳粉样品未检出过沙门氏菌,但是近两年我国发生的细菌性中毒事件中由沙门氏菌引起的事件仍占据首位^[2,3],因此沙门氏菌也是预包装柳州螺蛳粉的重要监测对象。DBS 45/034-2018^[1]规定预包装柳州螺蛳粉对沙门氏菌的检测方法是传统培养法,由于沙门氏菌血清型种类繁多造成传统的培养方法过程繁杂,从开始培养到生化鉴定结束往往需要 7 d,耗费大量的时间、人力和物力,大大影响检测的时效性,因此预包装柳州螺蛳粉中沙门氏菌快速检测方法的建立对预包装柳州螺蛳粉生产监管有重要意义。

实时荧光 PCR 是一种灵敏度高、特异性强、检测时效短的检测方法,广泛应用于药品^[4]、食品致病微生物^[5]和转基因食品^[6]的检测。虽然实时荧光 PCR 法对沙门氏菌的检测在国内常有报道,但是检测的样品大多是蔬菜^[7]、肉类^[8,9]和乳制品^[10,11]等基质简单的食品。预包装螺蛳粉基质复杂包含了发酵食品(酸笋和酸豆角)、膨化食品(腐竹)、

油脂(辣椒油)、醋酸以及高盐的酱料。基质复杂的食品中一些成分对 PCR 扩增有一定的抑制作用,可能导致漏检或出现假阴性结果^[12,13],而国内对基质复杂的食品中沙门氏菌检测研究鲜有报道,因此,实时荧光 PCR 对预包装螺蛳粉中沙门氏菌检测的准确性需进一步研究。本研究根据沙门氏菌 *invA* 基因设计探针和引物,建立预包装柳州螺蛳粉中沙门氏菌实时荧光 PCR 的快速检测方法,以期制定预包装柳州螺蛳粉中沙门氏菌的快速检测方法标准提供参考。

2 材料与方法

2.1 菌种、试剂和仪器

本实验所用的菌株如表 1 所示。

参照 Genbank 提供的沙门氏菌 *invA* 基因保守序列设计引物和探针。引物序列为:上游引物 CGGGTCAAGGCTGAGGAA; 下游引物 TGCTGAAGTTGAGGATGTTATTTCG; TaqMan 探针: ACTGCCAGAGGTCTGACGGATCCCT, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 试验用菌株信息
Table 1 Information of strains in this study

菌种名称	来源
肠炎沙门氏菌(<i>Salmonella enteritidis</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC13076)
猪霍乱沙门氏菌(<i>Salmonella choleraesuis</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC10708)
鸡白痢沙门氏菌(<i>Salmonella pullorum</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC13036)
亚利桑那沙门氏菌(<i>Salmonella arizonae</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC13314)
鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	广西壮族自治区疾控预防中心
斯坦利沙门氏菌(<i>Salmonella stanley</i>)	广西壮族自治区疾控预防中心
汤卜逊沙门氏菌(<i>Salmonella thompson</i>)	广西壮族自治区疾控预防中心
里森沙门氏菌(<i>Salmonella risen</i>)	广西壮族自治区疾控预防中心
阿贡纳沙门氏菌(<i>Salmonella agona</i>)	广西壮族自治区疾控预防中心
乙型副伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella paratyphi</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B) 50094)
大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)44103)
表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)26069)
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)10104)
志贺氏菌(<i>Shigella castellani</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)51572)
单核增生李斯特氏菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC19115)
金黄色葡萄菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)26003)
阪崎肠杆菌(<i>Bntorobater sakazakii</i>)	美国菌种保藏中心(ATCC29544)
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC(B)63501)
阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>)	本实验室分离
肺炎克雷伯菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	本实验室分离

缓冲蛋白胨水(buffer peptone water, BPW)、平板计数琼脂培养基(plate count agar, PCA)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(xylose lysine deoxybile, XLD)、脑心浸出液肉汤(brain heart infusion, BHI)、沙门显色培养基、沙门氏菌鉴定试剂盒(广东环凯生物科技有限公司); Premix Ex Taq™、细菌基因组 DNA 提取试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

移液器(德国 Eppendorf 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR(美国 ABI 公司); Sigma1-14 型离心机(德国 Sigma 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 取样和增菌

一步增菌: 预包装柳州螺蛳粉调料包混合均匀后称取 25 g 至 225 mL BPW 的增菌液中, 36 °C 增菌 18 h 后取 1 mL 增菌液提取 DNA。

二步增菌^[14]: 预包装柳州螺蛳粉调料包混合均匀后称取 25 g 至 225 mL BPW 的增菌液中, 36 °C 增菌 8 h, 然后吸取 1 mL 分别加至 SC 和 TTB。SC、TTB 分别于 36 °C 和 42 °C 培养 24 h 后各吸取 0.5 mL 合成 1 mL 提取 DNA。

2.2.2 DNA 模板制备

试剂盒提取法: 1 mL 的增菌液于 12000 r/min 离心 2 min 收集细胞后, 按 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit 试剂盒说明提取基因组 DNA。

水煮法^[15]: 取 1 mL 增菌液 8000 r/min 离心 5 min 弃去上清, 然后取 50 μL DNA 提取液重悬, 水煮 5 min 后 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清放置 -20 °C 备用。

2.2.3 荧光反应体系优化

研究 20 μL 实时荧光反应体系中的最佳探针浓度, 设置 4 组不同终浓度的探针分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L, 体系中同时还包含 10 μL Premix Ex Taq(2×)、引物终浓度为 0.2 μmol/L、0.2 μL 参比荧光、2 μL 的基因组 DNA, 分别用无菌水补足剩余的体积。实时荧光 PCR 仪反应程序参照 Premix Ex Taq™ 说明书为: 95 °C 预变性 30 s, 随后是 40 个循环的 95 °C 变性 5 s 以及 60 °C 复性和延伸 34 s。

2.2.4 特异性检测

取阳性菌株 10 株(乙型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、亚利桑那沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、汤卜逊沙门氏菌、里森沙门氏菌、阿贡纳沙门氏菌、斯坦利沙门氏菌)和非阳性菌株 10 株(金黄色葡萄球菌、福氏志贺菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、阪崎肠杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏菌、单增李斯特氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌)按 2.2.2 水煮法制备 DNA 模板后每个样做 2 个平行分别进行实时荧光 PCR 检测。

2.2.5 灵敏度检测

取一环乙型副伤寒沙门氏菌标准菌株至 BHI 中 36 °C 过夜培养, 经平板菌落计数浓度为 1.0×10^9 CFU/mL, 取

1 mL 培养液按 2.2.2 两种方法分别制备模板 DNA, 进行 10 倍梯度稀释至 10^{-8} 后每个样做 2 个平行上机检测。

2.2.6 模拟样品检测

称取 25 g 预包装柳州螺蛳粉样品, 以无菌水做为对照样品, 按 0、4、10 CFU 三个梯度污染乙型副伤寒沙门氏菌, 每份样品中加入 225 mL 缓冲蛋白胨水, 用拍打器拍打 1 min, 36 °C 培养, 分别按一步增菌法和二步增菌法进行操作, 另作平行样按 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》进行检测。由于对预包装螺蛳粉监督检验过程中发现大肠菌群指标异常的概率比较大, 超标的样品大肠菌群污染程度一般在 200 CFU 的水平, 因此本研究额外加入总计 200 CFU 的肺炎克雷伯氏菌和阴沟肠杆菌做为干扰菌模拟污染样品。

3 结果与分析

3.1 荧光反应体系优化结果

荧光反应图谱显示 4 组不同终浓度探针的荧光曲线起峰时间一致, 但是探针终浓度为 0.2 μmol/L 的一组相对于其他 3 组斜率更高, 表明最佳探针终浓度为 0.2 μmol/L, 结果如图 1 所示。

3.2 特异性检测结果

10 株沙门氏菌均产生荧光反应而 10 株非沙门氏菌均不产生荧光反应, 表明引物和探针具有良好的特异性, 结果如图 2 所示。

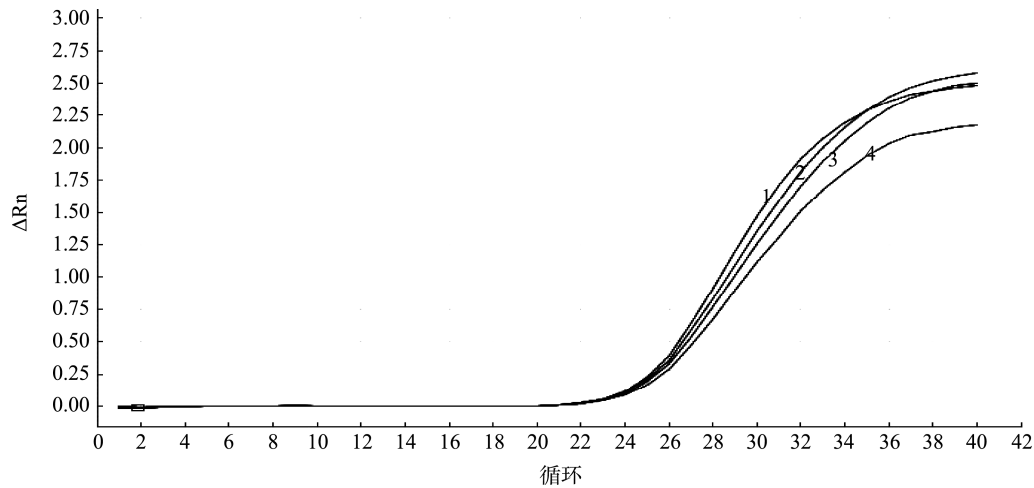
3.3 灵敏度检测结果

两种提取方法的 DNA 模板均可以在 10^{-7} 倍稀释度时检出荧光信号, 而 10^{-8} 倍稀释度无荧光信号检出, 表明其最低能够检测出 100 CFU/mL 沙门氏菌, 结果如图 3、图 4 所示, 但是水煮法相对试剂盒法操作更简便, 成本更低。对水煮法提取的模板进行梯度稀释后建立标准曲线, 如图 5 所示, 标准曲线斜率为 -3.25, $r^2=0.998$, 扩增效率 103.92%。

3.4 模拟样品检测和最低检出限结果

以预包装柳州螺蛳粉为样品, 无菌水为对照样品进行模拟污染样品实验, 污染水平见表 2, 按一步增菌和两步增菌法进行增菌培养后, 经实时荧光 PCR 检测, 无沙门氏菌污染的样品没有检测出荧光信号, 而污染沙门氏菌的样品均扩增出预期相符的沙门氏菌阳性荧光曲线, 其结果与国标法检测结果一致, 见表 2。

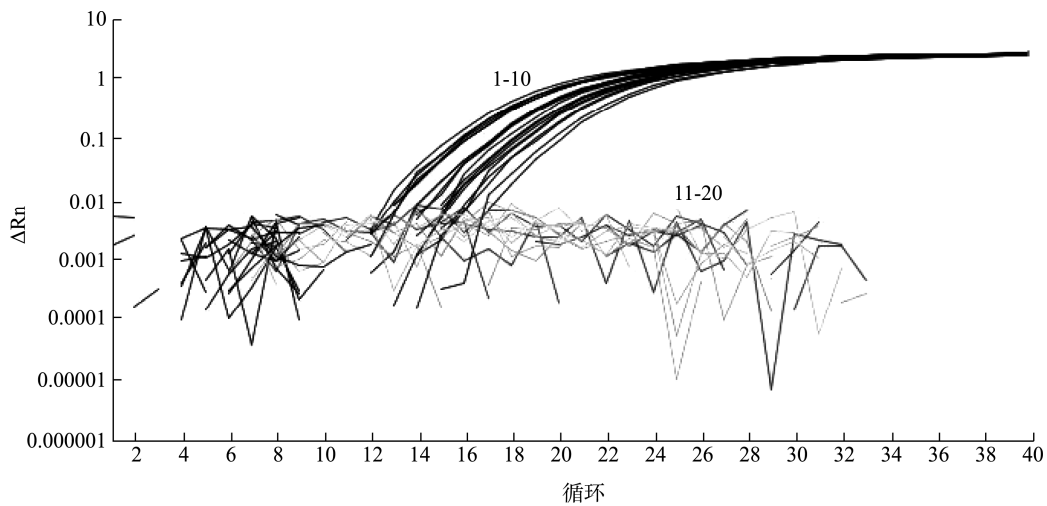
表 2 结果显示, 由于二步增菌法培养时间长, 在相同污染水平下, 二步增菌法的 CT 值低于一步增菌法。另一方面, 一步增菌法的结果显示预包装柳州螺蛳粉基质和干扰菌都会使 CT 值明显增加而且 CT 值和沙门氏菌接种量呈反比; 而当沙门氏菌没有受到样品基质和干扰菌影响条



注: 1~4 的探针浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 1 探针优化扩增曲线图

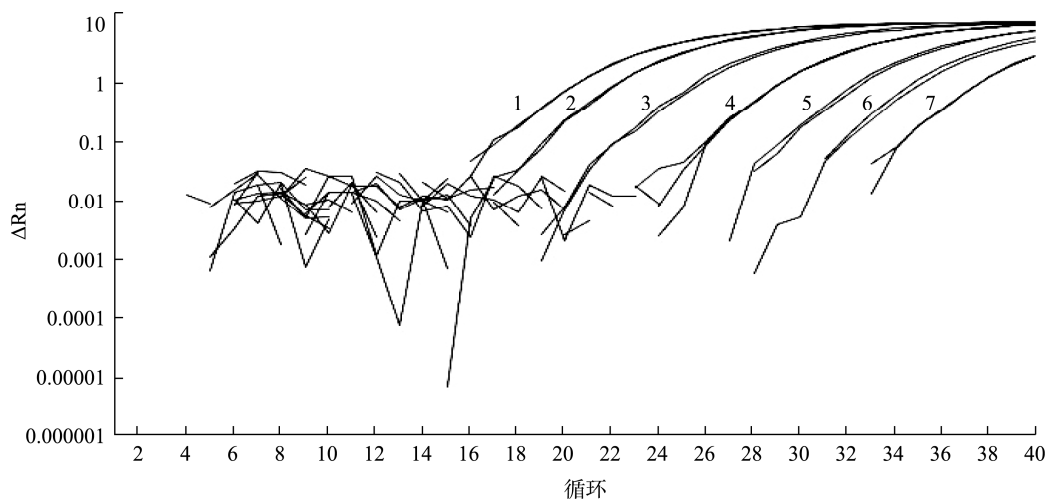
Fig.1 Amplification curve of probe optimization



注: 1~10 阳性菌株; 11~20 非阳性菌株。

图 2 特异性检测扩增曲线图

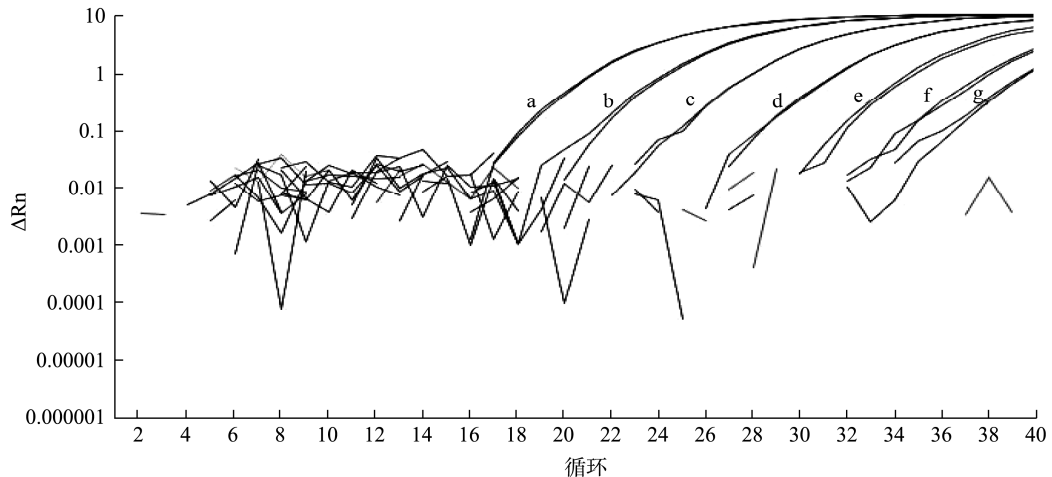
Fig.2 Amplification curve of specificity test



注: 1~7 分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍数的稀释。

图 3 DNA 试剂盒提取法实时荧光 PCR 灵敏度扩增曲线图

Fig.3 Detection sensitivity of DNA is extracted in kit extraction method by real-time-PCR



注: a~g 分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍数的稀释。

图 4 DNA 水煮提取法荧光 PCR 灵敏度扩增曲线图

Fig.4 Detection sensitivity of DNA is extracted in boiling method by RT-PCR

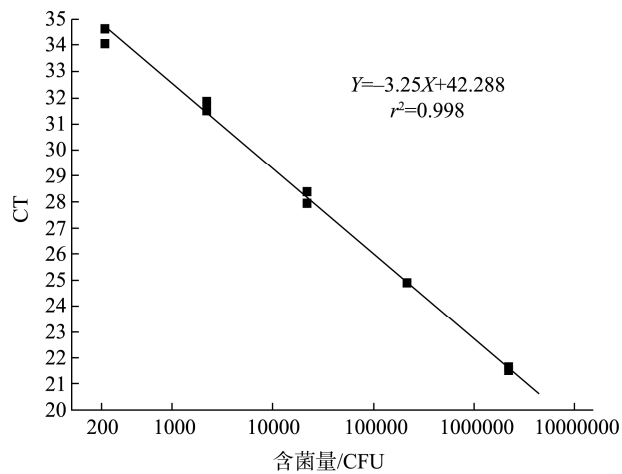


图 5 标准曲线
Fig.5 Standard curve

件下在经 18 h 增殖后达到相同的浓度, CT 并不随接种量而变化。因为实时荧光 PCR 的 CT 值是跟模板量成反比的, 所以 CT 值变高可能是因为螺蛳粉调料包基质和干扰菌对沙门氏菌的生长造成影响, 从而导致一步增菌法中增菌液的沙门氏菌含量降低造成的。

上述试验结果显示一步增菌法的检测结果受到接种量、样品基质和干扰菌的影响导致 CT 值出现比较大的波动。为了比较实时荧光 PCR(一步增菌法)与国标法的检测结果是否存在差异, 对 10 批预包装柳州螺蛳粉样品和 70 批污染不同水平沙门氏菌的预包装柳州螺蛳粉样品进行检测, 结果如表 3 所示。

表 3 的结果显示 3 个不同沙门氏菌污染水平的样品进行一步增菌后用实时荧光 PCR 检测均呈阳性反应; 在添加沙门氏菌(17 ± 4.6) CFU/25 g 的污染水平上, 国标法和实时荧光 PCR 法的检测结果一致, 但是国标法检测污染(4 ± 1) CFU/25 g 沙门氏菌的低污染样品结果中出现了假阴性的结果。

表 2 模拟污染沙门氏菌样品实时荧光 PCR 的检测结果
Table 2 Real time-PCR results of simulated polluted *Salmonella* samples

样品种类	人工污染水平		实时荧光 PCR 法(CT 值)		国标法(GB 4789.4-2016) ^[14]
	沙门氏菌 CFU/25 g	干扰菌 CFU/25 g	一步增菌法	第二步增菌法	
无菌水 25 mL	0		NA	NA	-
	4	0	16.55±0.15	15.99±0.14	+
	10		16.53±0.37	15.85±0.33	+
	0		NA	NA	-
	4	2.0×10^2	25.74±0.31	14.78±0.33	+
	10		21.54±0.07	15.43±0.08	+
预包装柳州螺蛳粉	0		NA	NA	-
	4	0	19.73±1.17	16.50±0.68	+
	10		18.21±0.41	15.62±0.05	+
	0		NA	NA	-
	4	2.0×10^2	26.03±0.13	17.36±0.15	+
	10		24.60±0.55	16.77±0.17	+

表 3 实时荧光 PCR 检测与国标法检测的结果
Table 3 Results of real time-PCR and GB method

样品	沙门氏菌污染水平 (CFU/25 g)	数量	实时荧光 PCR 法(一步增菌法)		国标法(GB 4789.4-2016) ^[14]	
			阳性	阴性	阳性	阴性
预包装柳州螺蛳粉	0	10	0	10	0	10
	4±1	30	30	0	27	3
	17±4.6	30	30	0	30	0
	> 100	10	10	0	10	0

4 讨论与结论

目前,国内大部分沙门氏菌检测标准都规定必须进行两步增菌^[14-16]。对于传统的培养方法,二步增菌法中的选择性增菌液能对沙门氏菌增菌的同时抑制杂菌生长,减少杂菌在后续选择性平板上生长从而减少假阴性结果出现。由于实时荧光 PCR 法是检测目标菌特异性基因,因此不受杂菌干扰,虽然在实验中发现预包装柳州螺蛳粉调料的基质和干扰菌对沙门氏菌生长有抑制作用,但是实时荧光 PCR 法检测灵敏度高,能检测微量的目标菌。本研究通过添加沙门氏菌模拟污染样品,经过一步增菌或二步增菌均可以检出 4 CFU/25 g 的沙门氏菌;70 批污染不同水平沙门氏菌的预包装柳州螺蛳粉样品的检测结果显示一步增菌后进行实时荧光 PCR 检测没有出现假阴性结果,因此利用实时荧光 PCR 法对预包装柳州螺蛳粉样品中沙门氏菌检测不经过二次增菌仍有很高的准确性。

在本研究中发现,30 批低水平沙门氏菌污染的预包装柳州螺蛳粉样品用传统培养方法检测时出现了 3 批假阴性结果。这可能是由于预包装柳州螺蛳粉基质和其含有一些杂菌对沙门氏菌的生长产生抑制,当利用传统方法进行检测时,由于增菌量不足导致划线分离步骤有一定概率没有捕获到沙门氏菌而出现假阴性的结果。有学者在其他的样品研究中发现普通 PCR 法也出现假阴性的结果^[17],而本研究利用实时荧光 PCR 对预包装柳州螺蛳粉进行检测时没有假阴性结果出现。另一方面,在实时荧光 PCR 检测过程中发现少量无添加沙门氏菌的柳州预包装螺蛳粉样品检测到轻微荧光反应,其 CT 值在 35~39 之间,而受污染样品的 CT 值通常小于 25。C. Almeida 等^[18]在研究中发现类似的现象,他们在接种量很低情况下用实时荧光 PCR 检测样品时出现了范围在 34~39 的 CT 值,而其他阳性结果的 CT 值一般在 16~19,作者认为这种现象有两个原因,一是实时荧光 PCR 的灵敏度高于传统方法,另一种原因是假阳性的结果。在本研究中以无菌水作为样品的空白对照时没有发现类似的荧光反应,上述现象可能是由于预包装螺蛳粉调料包来源复杂而受到少量沙门氏菌基因的污染,当利用实时荧光 PCR 法检测时扩增出微弱的荧光信号,但是也不

排除在制备 DNA 模板时有微量的交叉污染或者探针冻融后质量下降造成的,具体的原因还有待研究。

总之,预包装螺蛳粉的基质和干扰菌会抑制沙门氏菌的生长,而食品污染致病菌常常是微量的^[19],同时样品复杂程度也会影响选择性培养基上的菌落形态^[20],因此利用传统方法进行检测时要警惕复杂基质以及低污染量的样品由于增菌不足而出现假阴性的现象。不同于传统方法,实时荧光 PCR 是一种基于特异性基因扩增的高灵敏度的检测方法,具有灵敏度高、特异性强、检测时限短的特点,在预包装柳州螺蛳粉中检测沙门氏菌的灵敏度达 100 CFU/mL,检出限低至 4 CFU/25 g,以缓冲蛋白胨水作为增菌液培养 18 h 后得到检测结果,可以用于预包装螺蛳粉中沙门氏菌的快速检测。

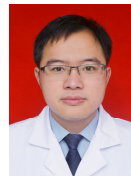
参考文献

- [1] DBS 45/034—2018 食品安全地方标准 柳州螺蛳粉[S]. DBS 45/034—2018 Local food safety standard—The Liuzhou river snail rice noodles [S].
- [2] 王霄晔,任婧寰,王哲,等. 2017 年全国食物中毒事件流行特征分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(5): 359-364.
Wang XY, Ren JH, Wang Z, et al. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017 [J]. Disease Surveill, 2018, 33(5): 359-364.
- [3] 王霄晔,吴晓旻,王锐,等. 2018 年第三季度全国食物中毒事件流行特征分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(8): 741-745.
Wang XY, Wang XY, Wang R, et al. Analysis of epidemic characteristics of food poisoning incidents in China in the third quarter of 2018 [J]. Disease Surveill, 2019, 34(8): 741-745.
- [4] 刘婷婷,王鲁华,王尊文,等. Taqman 荧光定量 PCR 法在药品沙门氏菌快速检测中的应用[J]. 中国药师, 2014, (2): 242-244.
Liu TT, Wang LH, Wang ZW et al. Application of fluorescence quantitative PCR in *Salmonella* rapid detection in drugs [J]. China Pharm, 2014, (2): 242-244.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 郭蕾,江洁,武晓松. 采用荧光定量 PCR 方法快速检测蔬菜中沙门氏

- 菌[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 123–127.
- Guo Q, Gang J, Wu XS. Detection of *Salmonella* in the vegetables by real-time PCR [J]. Food Res Dev, 2016, 37(7): 123–127.
- [8] 李亚茹, 周冬根, 夏杏洲, 等. 免疫磁珠分离-实时荧光 PCR 快速检测虾中沙门氏菌[J]. 现代食品科技, 2017, 33(11): 235–242.
- Li YR, Zhou DG, Xia XZ, et al. Rapid detection of *Salmonella* in Shrimp by immunomagnetic separation combined with Real-time PCR [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(11): 235–242.
- [9] 荣策, 孙铭英, 那晗, 等. 建立 Taqman 探针实时荧光 PCR 检测食品中肠炎沙门氏菌的方法[J]. 中国卫生产业, 2012, (27): 13–15, 17.
- Rong C, Shun MY, Na H, et al. The detection of *Salmonella* enteritidis with taqman probe by real-time fluorescent PCR in food industry [J]. China Health Ind, 2012, (27): 13–15, 17.
- [10] 姚笛, 徐磊, 佐兆杭, 等. 牛乳中沙门氏菌的荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国乳品工业, 2019, (7): 42–45.
- Yao D, Xu L, Zhuo ZH, et al. Establishment of fluorogenic quantitative PCR method for detection of *Salmonella* in milk [J]. China Dairy Ind, 2019, (7): 42–45.
- [11] 刘宽, 王芬, 陈晓平, 等. 一种基于荧光定量 PCR 的自动化检测装备初探[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 191–195.
- Liu K, Wang F, Chen XP, et al. Preliminary study of automatic inspection equipment based on quantitative PCR method [J]. Food Ind, 2018, 39(9): 191–195.
- [12] Lusk TS, Strain E, Kase JA. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in mexican and central American-style cheese and other milk products [J]. Food Microbiol, 2013, 34(1): 100–105.
- [13] Park SH, Aydin M, Khatiwara A, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products [J]. Food Microbiol, 2014, 38(4): 250–262.
- [14] 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 microbiology examination: *Salmonella* [S].
- [15] SN/T 1870—2016 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法[S].
- SN/T 1870—2016 Method for the detection of pathogens in food for export—Real-time PCR method [S].
- [16] GB/T 13091—2018 饲料中沙门氏菌的测定[S].
- GB/T 13091—2018 Determination of *Salmonella* in feeds [S].
- [17] Liming SH, Bhagwat AA. Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 95(2): 177–187.
- [18] Almeida C, Cerqueira L, Azevedo NE, et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 161(1): 16–22.
- [19] Jasson V, Baert L, Uyttendaele M. Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 145(2–3): 488–491.
- [20] Nassib TA, El-Din MZ, El-Sharoud WM. Assessment of the presence of *Salmonella* spp. in Egyptian dairy products using various detection media [J]. Letters Appl Microbiol, 2003, 37(5): 405–409.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



谢雨龙, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。
E-mail: xyulong0523@163.com