

食品中椰毒假单胞菌酵米面亚种实时荧光 PCR 检测的研究

林捷*, 方陈玉, 陆晶芳, 尹丹韩, 赵奇琦, 王加胜

(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310000)

摘要: **目的** 建立食品中椰毒假单胞菌酵米面亚种实时荧光 PCR 检测方法。**方法** 根据椰毒假单胞菌酵米面亚种 16S~23S rRNA 基因片段序列, 用 Oligo7 设计一对特异性引物和一个 TaqMan 探针, 摸索最佳退火温度, 最佳引物和探针浓度, 建立椰毒假单胞菌酵米面亚种实时荧光 PCR 检测方法。通过对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌以及 22 种其他标准菌株进行实时荧光 PCR 检测, 验证本法的特异性和抗干扰性。同时从菌液浓度和 DNA 浓度水平上进行研究, 确定该检测方法的灵敏度。**结果** 用该方法检测 23 种菌, 除唐菖蒲伯克霍尔德氏菌外, 其他 22 种细菌均为阴性。抗干扰性试验显示杂菌对检测结果不影响, 本法抗干扰能力强。通过灵敏度试验的研究, 确定本法检测椰毒假单胞菌酵米面亚种的菌液灵敏度为 1×10^2 CFU/mL, DNA 灵敏度为 250 fg/ μ L。**结论** 本试验设计的引物和探针具有较强特异性、抗干扰性以及灵敏度, 该方法具有很好的研究价值和应用前景。**关键词:** 椰毒假单胞菌酵米面亚种; 实时荧光 PCR; TaqMan 探针

Detection of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* by fluorescence real-time PCR method

LIN Jie*, FANG Chen-Yu, LU Jing-Fang, YIN Dan-Han, ZHAO Qi-Qi, WANG Jia-Sheng

(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a fluorescence real-time PCR method to detect *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farinofermentans* in food. **Methods** Species-specific primers and TaqMan fluorescent probe were designed by oligo7 software according to the conserved sequence of 16S~23S rRNA of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*. The optimum annealing temperature, probe and primer concentration were explored. A real-time fluorescent PCR detection method for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* was established. The specificity and anti-interference of this method were verified by real-time PCR detection of *Burkholderia gladiolus* and 22 other standard strains. At the same time, the sensitivity of the method was determined by studying the concentration of bacterial solution and DNA. **Results** This method was used to detect 23 kinds of bacteria, it showed that except *Burkholderia gladiolus*, 22 kinds of bacteria were negative. The anti-interference test showed that the mixed bacteria had no effect on the detection result, and the method had strong anti-interference ability. The sensitivity of fluorescence real-time PCR to detect *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* was 1×10^2 CFU/mL and that of DNA was 250 fg/ μ L. **Conclusion** The primers and probe designed in this study have strong specificity, anti-interference quality and sensitivity. This method is valuable for research and application prospects.

*通讯作者: 林捷, 助理工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。E-mail: 19769079@qq.com

*Corresponding author: LIN-Jie, Assistant Engineer, Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310000, China. E-mail: 19769079@qq.com

KEY WORDS: *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*; fluorescence real-time PCR; TaqMan probe

1 引言

椰毒假单胞菌酵米面亚种 (*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*) 简称椰酵假单胞菌, 是 1977 年在我国东北糯米面中毒食物中发现的一种新的食物中毒菌^[1], 在 2003 年被划为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia gladioli*) 的一个病原型^[2], 中毒后平均死亡率可达 41.8%^[3]。该菌产生的米酵菌酸是引起食物中毒和死亡的主要毒性代谢产物^[3,4]。椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒流行区域广, 涉及食品种类多, 主要包括谷类发酵制品, 变质银耳及薯类制品等^[4]。目前对椰毒假单胞菌酵米面亚种的检验主要是采用传统的检测方法, 如 GB/T 4789.29-2003 《食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验》^[5], 整个检验过程包括细菌增菌、分离纯化、生化鉴定、血清分型等, 该过程检测周期长易受环境及人为因素的影响且灵敏度不高。在遇到突发疫情时, 用传统的检测方法很难满足需求。通过多年研究, 椰毒假单胞菌酵米面亚种的保守序列 16S rRNA、23S rRNA 以及 16S~23S rRNA 间区序列已经比较明确, 研究者相继建立了基于序列的 PCR、产物测序分析等椰毒假单胞菌酵米面亚种分子分析技术^[3,6-8], 但这些技术大多需依赖后续的电泳过程, 操作过程相对繁琐。目前, 在细菌和病毒检测领域 PCR 技术和实时荧光 PCR 技术已得到广泛应用。但是普通 PCR 法需要电泳后查看结果。而基于 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测具有灵敏度高、检测迅速、操作简单、定量准确的优势, 在致病菌检测中得到广泛的应用^[9-11]。本研究以椰毒假单胞菌酵米面亚种的 16S~23S rRNA 为靶序列, 采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术建立食品中椰毒假单胞菌酵米面亚种快速检测方法, 以期满足大批量样品的检测或突发疫情快速检测的需求。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

BD720 生化培养箱(德国 BINDER 公司); ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); MK-10 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); Nanodrop one 紫外分光光度计(美国 Thermo 公司); 1-14 台式离心机(德国 Sigma 公司)。

2X TaqMan Fast qPCR Master Mix(上海生物工程股份有限公司); 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(广州迪奥公司)。

PCR 引物和探针委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂(北京陆桥技术股份有限公司); GVC 培养基、PDA 培养基(广东环凯

微生物科技股份有限公司)。

2.2 菌种

实验中所用 23 株标准菌株均为微生物实验室保存的传代菌种。具体来源及相应的菌株编号见表 1。

2.3 引物及探针的设计

根据 GenBank 中公布的椰毒假单胞菌酵米面亚种 16S~23S rRNA 间区序列, 用 oligo7 软件设计一对特异性引物和一个 TaqMan 探针。引物和探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物, 探针序列见表 2。

2.4 实验方法

2.4.1 菌株的培养和细菌基因组 DNA 模板制备

取表 1 中 23 种保存菌株磁珠分别接种在胰酪大豆胨液体培养基, 于 36 °C 培养 18~24 h。培养好的菌液, 用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA, 用 Nanodrop one 测定 DNA 浓度作为实时荧光 PCR 的模板, 置 -20 °C 保存。

2.4.2 荧光 PCR 反应体系及反应条件的优化

以相同浓度唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 DNA 提取物为阳性模板, 设置 3 组退火温度 50、55、60 °C, 根据扩增曲线的 Ct 值, 确定最佳退火温度。在确定的最佳退火温度下, 设置引物浓度 0.3~0.7 μL(10 μmol/L), 探针浓度 0.3~0.7 μL(10 μmol/L), 采用矩阵法选择最佳引物和探针浓度。

2.4.3 特异性实验

取上述标准菌株进行实时荧光 PCR 检测, 其中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌标准菌株为阳性对照, 单核细胞增生李斯特氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌, 蜡样芽孢杆菌、阪崎肠杆菌等 22 株标准菌株为阴性对照, 双蒸水为空白对照来验证实时荧光 PCR 法对椰毒假单胞菌酵米面亚种的特异性。

2.4.4 抗干扰性实验

制备混合菌液, 其中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌浓度为 10³ CFU/mL, 干扰菌金黄色葡萄球菌, 大肠埃希氏菌, 铜绿假单胞菌, 乙型副伤寒沙门氏菌的浓度为 10⁷ CFU/mL。取混合菌液 1 mL, 以相同浓度唐菖蒲伯克霍尔德氏菌菌液为阳性对照, 进行实时荧光 PCR 检测。

2.4.5 灵敏度实验

将唐菖蒲伯克霍尔德氏菌菌悬液用 0.85% 生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 制备系列浓度为 1×10⁸、1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴、1×10³、1×10²、10¹ CFU/mL 的菌悬液。取各稀释度菌悬液 1 mL, 进行实时荧光 PCR 检测。

将 2.4.1 中制备的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 DNA 模板用双蒸水进行 10 倍梯度稀释, 制备系列浓度为 250 ng/μL、25 ng/μL、2.5 ng/μL、250 pg/μL、25 pg/μL、2.5 pg/μL、250 fg/μL、25 fg/μL、2.5 fg/μL 的模板。取各稀释度模板 1 μL, 进行荧光 PCR 检测。

表 1 实验用菌株
Table 1 Strains for experiment

序号	菌种名称	菌种编号	来源
1	肠道聚集性大肠埃希氏菌 <i>Enteroaggregative Escherichia coli</i>	CICC 24186	中国工业微生物菌种保藏管理中心
2	肠道侵袭性大肠埃希氏菌 <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>	CICC 24188	中国工业微生物菌种保藏管理中心
3	肠道出血性大肠埃希氏菌 <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>	CICC 24187	中国工业微生物菌种保藏管理中心
4	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	CMCC(B)63303	中国食品药品检定研究院
5	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	CMCC(B)44102	中国食品药品检定研究院
6	乙型副伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella paratyphi β</i>	CMCC(B)50094	中国食品药品检定研究院
7	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	CMCC(B)63501	中国食品药品检定研究院
8	短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	CMCC(B)63202	中国食品药品检定研究院
9	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC(B)26003	中国食品药品检定研究院
10	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMCC(B)10104	中国食品药品检定研究院
11	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	广东环凯微生物科技有限公司
12	福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	CMCC(B)51572	广东环凯微生物科技有限公司
13	阪崎肠杆菌 <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	广东环凯微生物科技有限公司
14	鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	广东环凯微生物科技有限公司
15	英诺克李斯特氏菌 <i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	广东环凯微生物科技有限公司
16	伊氏李斯特氏菌 <i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	广东环凯微生物科技有限公司
17	单核细胞增生李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	广东环凯微生物科技有限公司
18	藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	CMCC(B)28001	广东环凯微生物科技有限公司
19	马红球菌 <i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939	广东环凯微生物科技有限公司
20	粪肠链球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	广东环凯微生物科技有限公司
21	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	CMCC(B)26069	广东环凯微生物科技有限公司
22	蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	ATCC 10203	广东环凯微生物科技有限公司
23	唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 <i>Burkholderia gladioli</i>	ATCC 10248	广东环凯微生物科技有限公司

表 2 实时荧光 PCR 引物及探针序列
Table 2 Nucleotide sequences of primers and probes for fluorescence real-time PCR

名称	序列	长度/bp
上游引物	5'GTCTTTGTGTCATTGGCGATT 3'	19
下游引物	5'ATACAATCACAACCCGGAT 3'	19
探针	FAM-5'-ACGCCATCTCAATAGACGCTT-3'- TAMRA	22

2.4.6 实际样品检测

近年来因食用凉拌木耳导致椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒事件报道较多,因此采用凉拌木耳作为检测样本。选取市售凉拌木耳 6 份,其中 5 份直接无菌取样 1 g,分别加入 20 mL GVC 培养基中,36 °C 培养 48 h,剩余 1 份加入唐菖蒲伯克霍尔德氏菌标准菌液混合后再进行同样的取样和培养操作,该样本作为阳性对照样本。取培养后的增菌液 1 mL 进行实时荧光 PCR 检测。

3 实验结果

3.1 荧光 PCR 反应体系和反应条件确立

在相同浓度阳性模板条件下,3 组退火温度 50、55、60 °C 对应的 Ct 值分别为 16.300、16.274、15.749;各浓度引物和探针对应的 Ct 值在 14.422~15.352 之间,其中引物浓度和探针浓度都为 0.5 μL(10 μmol/L)时,反应的 Ct 值最

小为 14.422, 具体数值见表 3。

由此, 确立:

反应体系为 25 μL : 2X TaqMan Fast qPCR Master Mix 12.5 μL 、上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、荧光探针 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)、DNA 模板 1 μL 、用双蒸水补足至 25 μL 。

反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 40 s, 收集荧光, 40 个循环。

3.2 特异性实验结果

以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌标准菌株为阳性对照, 单核细胞增生李斯特氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌, 蜡样芽孢杆菌、阪崎肠杆菌等 22 株标准菌株作为阴性对照, 双蒸水为空白对照验证实时荧光 PCR 法检测椰毒假单胞菌酵米亚种的特异性。实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米亚种特异性试验见图 1。

结果表明, 仅唐菖蒲伯克霍尔德氏菌出现了特异性扩增, 其他 22 种菌无扩增曲线, 说明所建立的荧光 PCR 方

法具有良好的特异性。

3.3 抗干扰性试验结果

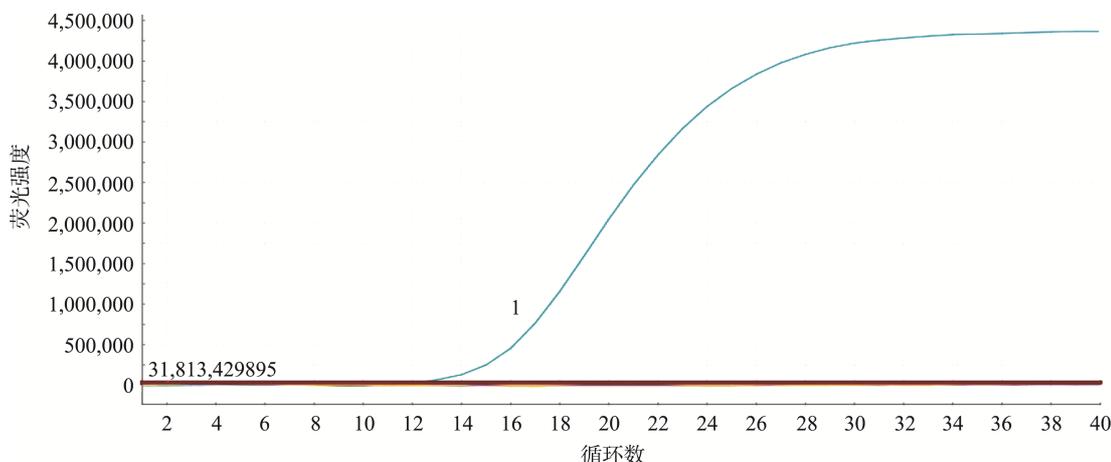
对混合菌液进行荧光 PCR 检测, 以含相同浓度唐菖蒲伯克霍尔德氏菌菌液为阳性对照, 抗干扰性试验结果见图 2。如图所示, 添加干扰菌的菌液和阳性对照几乎同时出现扩增曲线, 说明建立的荧光 PCR 检测方法不受杂菌影响, 抗干扰能力强, 与该方法的特异性结果相符合。

3.4 灵敏度实验结果

分别取唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 10^1 CFU/mL 的菌悬液 1 mL 进行 DNA 提取, 提取的 DNA 进行荧光定量 PCR 检测。实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米亚种纯培养物水平灵敏度试验见图 3。如图所示, 除最低稀释度 10^1 CFU/mL 无扩增曲线外, 其他浓度均有不同程度扩增, 因此确定菌液检出限为 1×10^2 CFU/mL。

表 3 引物和探针浓度的优化
Table 3 The optimization concentration of probe and primer

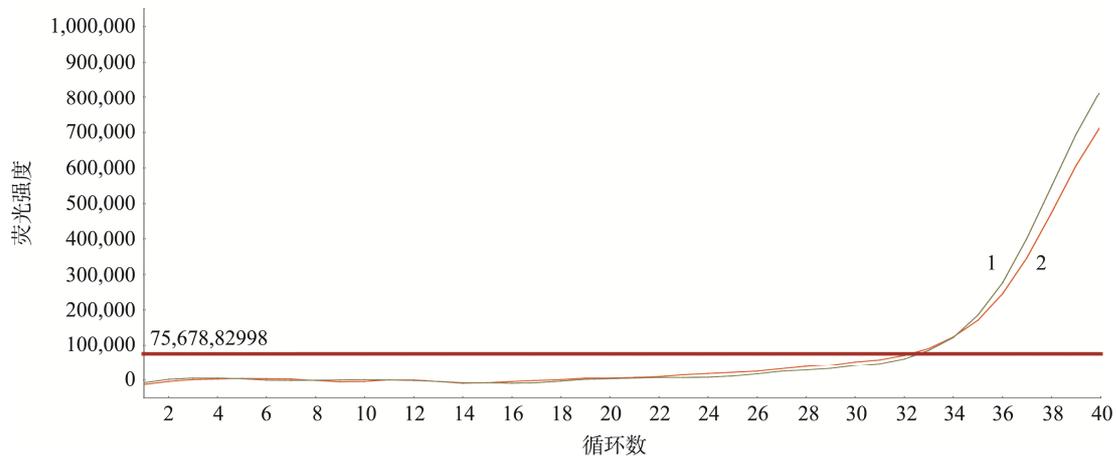
Ct 值	引物浓度 10 $\mu\text{mol/L}$					
	0.3 μL	0.4 μL	0.5 μL	0.6 μL	0.7 μL	
探针浓度 10 μM	0.3 μL	15.352	14.926	15.020	14.800	14.811
	0.4 μL	15.234	14.765	14.862	15.086	14.792
	0.5 μL	14.996	14.762	14.422	15.230	14.937
	0.6 μL	14.869	14.715	14.541	14.862	14.766
	0.7 μL	14.914	14.677	14.465	14.511	14.638



注: 1. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌

图 1 实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米亚种特异性试验

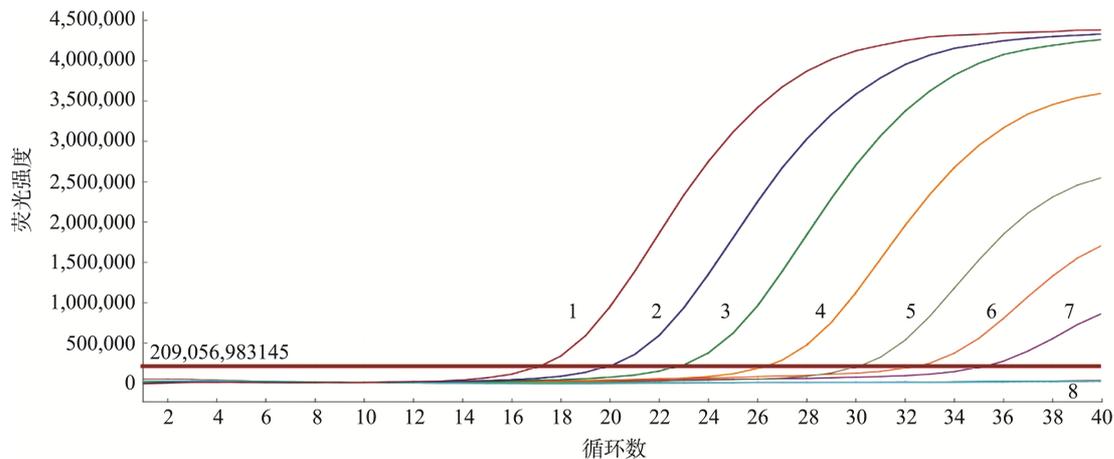
Fig.1 Specificity detection of fluorescence real-time PCR assay for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*



注: 1. 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌液; 2. 混合菌液

图 2 实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米面亚种抗干扰性试验

Fig.2 Anti-interference detection of fluorescence real-time PCR assay for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*



注: 1. 1×10^8 CFU/mL; 2. 1×10^7 CFU/mL; 3. 1×10^6 CFU/mL; 4. 1×10^5 CFU/mL; 5. 1×10^4 CFU/mL;
6. 1×10^3 CFU/mL; 7. 1×10^2 CFU/mL; 8. 10^1 CFU/mL

图 3 实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米面亚种纯培养物水平灵敏度试验

Fig.3 Sensitivity detection of qRT-PCR assay for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* in the level of microbial concentration

分别取唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 DNA 浓度为 250 ng/ μ L、25 ng/ μ L、2.5 ng/ μ L、250 g/ μ L、25 pg/ μ L、2.5 pg/ μ L、250 fg/ μ L、25 fg/ μ L、2.5 fg/ μ L 的模板 1 μ L, 进行荧光定量 PCR 检测。实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米面亚种 DNA 水平灵敏度试验见图 4。如图所示, 除 25 fg/ μ L、2.5 fg/ μ L 无扩增曲线外, 其他浓度均有不同程度扩增, 因此确定 DNA 检出限为 250 fg/ μ L。

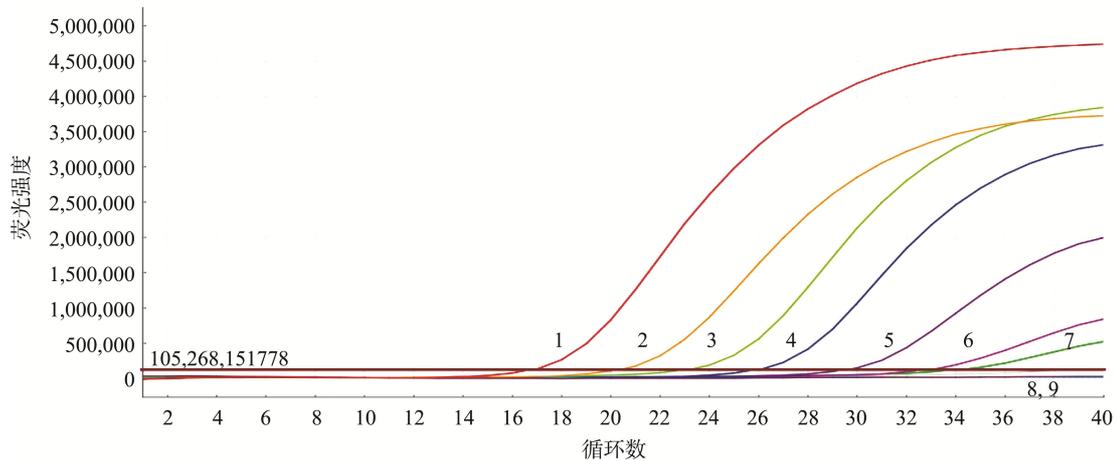
3.5 实际样品检测结果

对凉拌木耳共 6 个样品的 GVC 增菌液进行 DNA 提取, 以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌为阳性对照, 进行实时荧光 PCR 检测, 实时荧光 PCR 检测样品中椰毒假单胞菌酵米面亚种试验见图 5。结果显示, 仅凉拌木耳阳性对照样品检

测出椰毒假单胞菌酵米面亚种。

4 结论

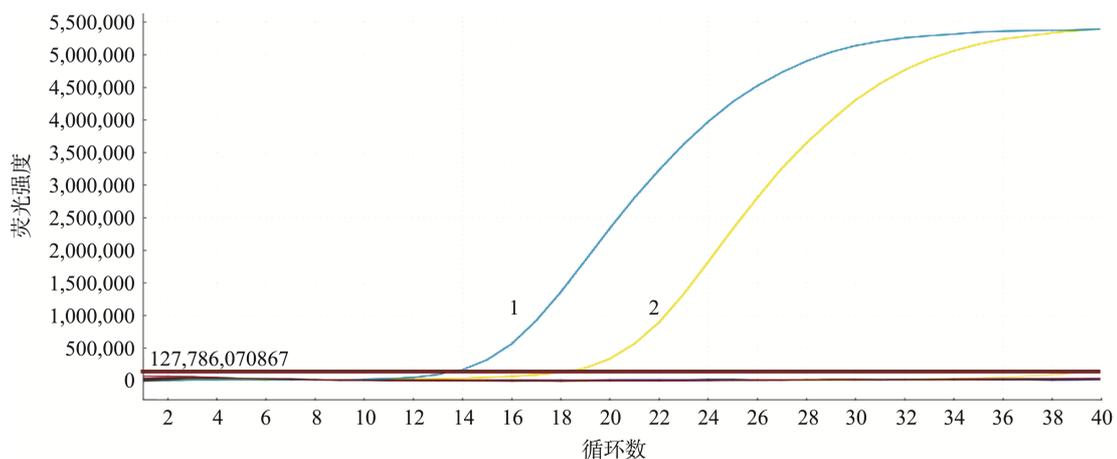
日常食品检测过程中, 椰毒假单胞菌酵米面亚种未被列为微生物的常规检验项目, 也并未有相关标准对该菌的限量值进行规定。但实际上近年来食用凉拌木耳导致椰毒假单胞菌酵米面亚种导致食物中毒事件时有发生, 尤其是夏季^[12]。椰毒假单胞菌酵米面亚种, 革兰氏阴性短杆菌, 大小为(2.5~3) μ m \times (0.5~1.0) μ m, 呈杆状、球杆状或稍弯曲, 无芽胞, 有鞭毛, 兼性厌氧, 但易在表面生长。最适生长温度为 37 $^{\circ}$ C, 最适产毒温度为 26 $^{\circ}$ C。pH 5-7 范围内生长较好。本菌抵抗力较弱, 56 $^{\circ}$ C 5 min 即可杀死, 对各种常用消



注: 1. 250 ng/μL; 2. 25 ng/μL; 3. 2.5 ng/μL; 4. 250 pg/μL; 5. 25 pg/μL;
6. 2.5 pg/μL; 7. 250 fg/μL; 8. 25 fg/μL; 9. 2.5 fg/μL

图 4 实时荧光 PCR 检测椰毒假单胞菌酵米亚种 DNA 水平灵敏度试验

Fig.4 Sensitivity detection of qRT-PCR assay for *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* in the level of DNA concentration



注: 1.唐菖蒲伯克霍尔德氏菌; 2.凉拌木耳阳性对照样本

图 5 实时荧光 PCR 检测样品中椰毒假单胞菌酵米亚种试验

Fig.5 Detection of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* in samples by qRT-PCR

毒剂抵抗力也不强,但其产生的小分子脂肪酸类毒素米酵菌酸,耐热,毒性强,不能被一般烹调方法所破坏,其对人和动物细胞产生毒性,损害人的肝、脑、肾等器官,严重的可导致死亡,至今尚无有效解毒药^[13,14]。因此,对易污染椰毒假单胞菌酵米亚种的食物应进行必要的监测及风险评估,掌握该菌污染情况及规律,降低该菌引起食物中毒的风险。

不同种属的细菌 16S-23S rRNA 基因间区序列具有高度特异性,广泛用于鉴别细菌的遗传关系^[15]。马晓燕等针对椰毒假单胞菌 16S-23S rRNA 建立了 LAM 快速检测体系^[7]。因此本研究以椰毒假单胞菌酵米亚种 16S-23S rRNA 间区序列为靶基因,设计特异性引物和 Taqman 探针,摸索

最佳退火温度、最佳引物和探针浓度,建立反应体系和反应条件。利用实时荧光 PCR 技术,对椰毒假单胞菌酵米亚种进行检测,整个检测时间缩短为 1 h。通过对唐菖蒲伯克霍尔德氏菌,22 种其他标准菌株及混合菌液进行实时荧光 PCR 检测,验证了本法对椰毒假单胞菌酵米亚种检测的特异性和抗干扰性。对不同菌液浓度和不同 DNA 浓度的唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的检测,确定本法检测椰毒假单胞菌酵米亚种的菌液灵敏度为 1×10^2 CFU/mL 和 DNA 灵敏度为 250 fg/μL。综上所述,本研究建立的实时荧光 PCR 法检测椰毒假单胞菌酵米亚种技术,具有特异性强,灵敏度高,检测快速等特点,能满足日常快速检测食品的要求,具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 焦振泉, 刘秀梅, 杨瑞馥, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种 16SrDNA 序列测定与分析[J]. 卫生研究, 1999, 28(4): 232-235.
Jiao ZQ, Liu XM, Yang RF, *et al.* Sequencing and analysis of 16S rDNA sequences for *P. cocovenenans* subsp. *farinofermentans* [J]. J Hyg Res, 1999, 28(4): 232-235.
- [2] Jiao ZQ, Kawamura Y, Mishima N, *et al.* Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: description of *B. gladioli* pathovar *cocovenans* and emended description of *B. gladioli* [J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(12): 915-925.
- [3] 焦振泉, 曹玮, 余东敏, 等. 椰毒假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌 16S-23S rRNA 基因间区序列的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(3): 197-203.
Jiao ZQ, Cao W, Yu DM, *et al.* Study on comparison of 16S ~ 23S rRNA Gene ISR sequence of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* strains and *Burkholderia gladioli* strains [J]. Chin J Food Hyg, 2008, 20(3): 197-203.
- [4] 李晓娟, 杨祖顺, 国译丹, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒的病原分离鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 36-39.
Li XL, Yang ZS, Guo YD, *et al.* Isolation and identification of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *Farino fermentans* from food poisoning accident [J]. Chin J food Hyg, 2016, 28(1): 36-39.
- [5] GB/T 4789.29-2003 食品卫生微生物学检验 椰毒假单胞菌酵米面亚种检验[S].
GB/T 4789.29-2003 Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* [S].
- [6] 邱茂锋, 刘秀梅, 杨瑞馥, 等. 用 rDNA 指纹图分析我国部分椰毒假单胞菌的分子流行病学特征[J]. 卫生研究, 1998, 27(1): 57-60.
Qiu MF, Liu XM, Yang RF, *et al.* Study on the molecular epidemiology characteristics of *Pseudomonas Cocovenenans* subsp. *farinofermentans* isolated from China with rDNA fingerprinting [J]. J Hyg Res, 1998, 27(1): 57-60.
- [7] 马晓燕, 张蕴哲, 王羽, 等. 环介导等温扩增技术快速检测椰毒假单胞菌的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 321-324.
Ma XY, Zhang YZ, Wang Y, *et al.* Rapid detection of *Pseudomonas cocovenenans* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(3): 321-324.
- [8] 郭云昌, 王岗, 杜春明, 等. 椰毒假单胞菌酵米面亚种脉冲场凝胶电泳分型的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 236-239.
Guo YC, Wang G, Du CM, *et al.* Molecular typing of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with PULSED-FIELD GEI electrophoresis [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(3): 236-239.
- [9] Bassler HA, Flood SJA, Livak KL, *et al.* Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3724-3728.
- [10] Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholera* O1, O139, non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4685-4693.
- [11] 胡兴娟, 沈颺, 余辉, 等. 多重荧光定量 PCR 法检测海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(4): 440-444
Hu XJ, Shen B, Yu H, *et al.* Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in seafoods using multiplex real-time quantitative PCR [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(4): 440-444.
- [12] 申屠平平, 朱珈慧, 徐小民, 等. 一起椰毒假单胞菌酵米面亚种引起的食物中毒调查[J]. 上海预防医学, 2019, 31(6): 466-468, 478.
Shentu PP, Zhu JH, Xu XM, *et al.* A food poisoning incident caused by *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* [J]. Shanghai J Prev Med, 2019, 31(6): 466-468, 478.
- [13] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒流行趋势浅析[J]. 中华预防医学杂志, 1996, (6): 54-56.
Liu XM. Analysis on the epidemic trend of food poisoning of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* [J]. Chin J Prev Med, 1996, (6): 54-56.
- [14] 郭学荣, 李振营, 程海鹰, 等. 椰毒假单胞菌食物中毒尸检 3 例[J]. 法医学杂志, 2011, 27(1): 75-76.
Guo XR, Li ZY, Cheng HY, *et al.* Autopsy of 3 cases of *Pseudomonas cocovenenans* food poisoning [J]. J Foren Med, 2011, 27(1): 75-76.
- [15] Stubbs SL, Brazier J, O'Neill G, *et al.* PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 461-463.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



林 捷, 助理工程师, 主要研究方向
为食品药品微生物检验。

E-mail: 19769079@qq.com