DOI:10.12441/spyswjs.20240531001 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0164-09

单核细胞增生李斯特氏菌活菌PMAxx-ddPCR检测方法的建立及应用

魏茂琳[1,2,4] 韩 钦[3] 王金凤[2] 姜彦芬[2] 王一诺[1,2,4] 王建昌[1,2,4*]

(1. 河北医科大学公共卫生学院,河北 石家庄 050017; 2. 石家庄海关技术中心,河北 石家庄 050051; 3. 河北国际旅行卫生保健中心,河北 石家庄 050091; 4. 河北省环境与人群健康重点实验室,河北 石家庄 050017)

摘要:【目的】将改良版叠氮溴化丙锭(improved propidium monoazide,PMAxx)与微滴式数字PCR(droplet digital PCR,ddPCR)技术相结合,建立一种针对单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*,LM)活菌的检测方法。**【方法】**对PMAxx终浓度、暗处理时间及曝光时间进行优化,建立最佳的PMAxx-ddPCR检测体系,并用不同体积比的LM活菌验证其准确性,考察PMAxx-ddPCR检测方法的特异性、灵敏性和重复性。用不同浓度LM活菌与死菌对奶酪棒样品进行人工污染,比较传统的平板计数法和作者建立的PMAxx-ddPCR检测方法的结果;进一步对市售金针菇和火腿肠进行检测,评估PMAxx-ddPCR检测方法的实际效果。**【结果】**在PMAxx终浓度为10 μmol/L、暗处理时间和曝光时间均为10 min时,PMAxx可显著抑制死菌DNA扩增,但对活菌DNA扩增没有显著影响。建立的PMAxx-ddPCR检测方法仅对LM产生特异性扩增,定量限为147 CFU/mL,相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)均小于20%,重复性较好。人工污染奶酪棒试验结果表明,平板计数法和PMAxx-ddPCR检测方法对LM的定量结果差异不显著(P>0.05)。进一步分析17份金针菇和16份火腿肠样品检测结果,PMAxx-ddPCR检测法和平板计数法均从7份金针菇样品中检出LM,且2种方法定量结果没有显著差异(P>0.05)。**【结论】**作者建立的LM活菌的PMAxx-ddPCR检测方法可对食品中LM活菌进行特异性定量检测。

关键词:改良版叠氮溴化丙锭;微滴式数字PCR;单核细胞增生李斯特氏菌;活菌;定量检测

Establishment and Application of a PMAxx-ddPCR Detection Method for Viable *Listeria monocytogenes*

WEI Maolin[1,2,4] *HAN Qin*[3] *WANG Jinfeng*[2] *JIANG Yanfen*[2]
WANG Yinuo[1,2,4] *WANG Jianchang*[1,2,4*]

(1. College of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Shijiazhuang Customs Technology Center, Shijiazhuang 050051, China; 3. Hebei International Travel Health Care Center, Shijiazhuang 050091, China; 4. Hebei Key Laboratory of Environment and Human Health, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: [**Objective**] A detection method for viable *Listeria monocytogenes* (LM) was established combining improved propidium monoazide (PMAxx) with droplet digital PCR (ddPCR). [**Method**] After optimization of the final PMAxx concentration, dark treatment time, and exposure time, the optimal PMAxx-ddPCR detection system was established. Different volume ratios of viable LM were employed to verify the accuracy of the PMAxx-ddPCR method, and the specificity, sensitivity, and reproducibility of this method were examined.

基金项目:河北省省级科技项目(22375504D)。

通信作者:王建昌(1981—),男,博士,正高级兽医师,硕士研究生导师,主要从事食源性致病菌的分子生物学检测研究。E-mail:jianchangwang1225@126.com

收稿日期:2024-05-31 **修回日期:**2024-07-22

Cheese stick samples were artificially contaminated with different concentrations of viable and dead LM and then used to compare the detection results of the conventional plate counting method and the PMAxx-ddPCR method established in this study. Additionally, commercially available enoki mushrooms and ham sausages were tested to evaluate the practical detection performance of the PMAxx-ddPCR method. [**Result**] At a final PMAxx concentration of 10 μmol/L, dark treatment time of 10 min, and exposure time of 10 min, PMAxx significantly inhibited the DNA amplification of dead bacteria, while having no significant effect on that of viable bacteria. The developed PMAxx-ddPCR method only generated specific amplification for LM, with a limit of quantification of 147 CFU/mL. The relative standard deviations (RSD) of the method were consistently less than 20%, indicating good repeatability. In the artificial contamination experiment of cheese sticks, the quantification results of LM by the plate counting method and the PMAxx-ddPCR method had no significant difference (P>0.05). Further detection of 17 enoki mushroom samples and 16 ham sausage samples revealed that LM was detected in 7 enoki mushroom samples by both PMAxx-ddPCR and plate counting methods. Moreover, the quantitative results of the two methods showed no significant difference (P>0.05). [**Conclusion**] A PMAxx-ddPCR method is established for detecting viable LM, enabling specific quantitative detection of viable LM in food.
Keywords: improved propidium monoazide; droplet digital PCR; *Listeria monocytogenes*; viable bacteria; quantitative detection

LM是一种常见的食源性致病菌，也是经常感染人类的李斯特菌[1]，分布广泛，对环境具有较强的适应能力[2]，常在肉制品、即食食品和新鲜农产品中检出[3-5]。食用被LM污染的食品易引发食物中毒，甚至还会引起败血症等严重影响身体健康的疾病，尤其对免疫力低下者、老年人以及孕妇的影响更大[6-7]。近年来，食品中检出LM已有较多报道：何源等[8]对2020—2022年重庆市2 730份食品样品进行LM检测，结果显示LM检出率为3.92%；Leclercq等[9]报道了法国2022年4—12月期间因食用受LM污染的素食奶酪而暴发了李斯特菌病；Chen等[10]报道了从上海市嘉定区236份零售禽肉样本中检测出41株LM，在冷藏、冷冻和室温样品中，冷藏家禽的检出率最高（25.40%），而冷冻家禽的检出率最低（13.33%）。对食品中的LM进行高效检测，尤其是对LM活菌的定量检测，对于保障食品安全至关重要。

目前LM的检测方法主要有传统培养法[11]和分子生物学检测方法[12-13]等。传统培养法作为LM检测的“金标准”，能够实现对食品中LM活菌的定量检测，但存在操作复杂、耗时长、灵敏度低等问题[14]。为了保持食品的新鲜度，人们常常会对食品采取冷藏、冷冻或者高盐腌制等处理。然而，这些处理操作很容易破坏食品中细菌的细胞膜，进而导致细菌死亡[15]。虽然细菌已经死亡，但死菌的核酸仍存在于食品中，若使用常规的实时荧光PCR等分子生物学方法进行检测，仍能产生阳性扩增[16-17]，即该方法无法区分样品中LM的存活状态[18]，易高估食品中LM的活菌含量。因此，开发针对LM活菌的快速定量检测方法尤为重要。目前，活菌的选择性检测方法主要是基于叠氮溴化乙锭（ethidium monoazide bromide，EMA）、叠氮溴化丙锭（propidium monoazide，PMA）等光反应染料的实时荧光PCR方法和数字PCR方法等[19-20]，其中PMA因危害小、抑制死菌核酸扩增效果好，成为检测活菌的常用染料[21]。PMA是一种具有DNA高亲和力的光反应染料，不具有细胞膜渗透性，无法穿透活细胞的完整细胞膜，只能选择性地穿透死细胞受损的细胞膜。进入细胞后，PMA嵌入双链DNA，在强烈的可见光下发生共价交联反应，从而对DNA进行永久性修饰。经过PMA化学修饰的DNA不能作为模板进行PCR扩增，而细胞膜完整的活菌DNA能够正常扩增[22-24]。PMAxx是PMA的升级替代版，与PMA的化学基团不同，PMAxx在偶氮基团上引入单键连接的取代基，因此PMAxx抑制死菌DNA扩增的能力更强，能更高效地区分死菌和活菌，提高检测的准确性和灵敏性[25-27]。作者将PMAxx与ddPCR技

术相结合，建立了一种高效、准确定量食品中LM活菌的检测方法，为食品安全领域的病原微生物检测提供了新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

LM（ATCC19114）、阪崎肠杆菌（ATCC29544）：美国模式培养物集存库（ATCC）；伊氏李斯特氏菌（CICC21663）、英诺克李斯特氏菌（CICC10297）、斯氏李斯特氏菌（CICC21671）、副溶血弧菌（CICC21617）、金黄色葡萄球菌（CICC10306）、大肠杆菌（CICC10899）：中国工业微生物菌种保藏管理中心。

PMAxx：美国Biotium公司；细菌基因组DNA提取试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；ddPCR Supermix for probes（no dUTP）（预混液）：美国BIO-RAD公司；奶酪棒、金针菇、火腿肠：购于超市和农贸市场。

1.2 仪器与设备

NanoDrop 2000c超微量分光光度计：ND 2000c型，美国Thermo Fisher Scientific公司；PMA光解仪：PL-PMA型，北京普林塞斯科技有限公司；ddPCR微滴生成仪：QX200™型，美国BIO-RAD公司；PCR仪：T100™型，美国BIO-RAD公司；ddPCR微滴读取仪：QX200™型，美国BIO-RAD公司。

1.3 方法

1.3.1 活菌悬液及死菌悬液的制备

将活化好的LM菌株用接种环划线接种于李斯特菌显色培养基上，36 ℃培养24 h，挑取单菌落接种至营养肉汤培养基中，36 ℃培养24 h后得到菌悬液。逐级吸取1 mL菌悬液至9 mL 0.85 g/dL的生理盐水中，制备3×10^5 CFU/mL的活菌悬液。取1 mL活菌悬液于沸水浴处理10 min，制备死菌悬液。将死菌悬液冷却至室温，吸取500 μL涂布于李斯特菌显色培养基上，36 ℃培养24 h后观察培养基上是否有菌落生长。

1.3.2 细菌基因组DNA的提取及ddPCR方法检测

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取LM基因组DNA，采用作者所在实验室已建立的LM ddPCR方法[28]。反应体系为：ddPCR Supermix for probes（no dUTP）（预混液）10 μL，ddPCR上下游引物（10 nmol/L）各1.8 μL，ddPCR探针（10 nmol/L）0.5 μL，模板1 μL，ddH_2O补至20 μL。反应条件为：95 ℃预变性10 min；94 ℃变性30 s，58.3 ℃退火60 s，45次循环；98 ℃灭酶10 min。引物、探针的序列见表1。

表1 引物、探针的序列

Table 1 Primer and probe sequence

引物/探针	序列（5′—3′）	扩增长度/bp
上游引物	ACTGAAGCAAAGGATGCATCTG	22
下游引物	TTTTCGATTGGCGTCTTAGGA	21
探针	FAM-CACCACCAGCATCTCCGCCTGC-BHQ1	22

1.3.3 PMAxx条件优化

1）PMAxx终浓度的优化：取100 μL的LM死菌悬液（3×10^5 CFU/mL）至1.5 mL离心管中，同时取100 μL的LM活菌悬液作为对照组，添加PMAxx至终浓度分别为0、10、20、30、40、50、60、90 μmol/L，充分混匀，200 r/min暗处理15 min，将离心管置于PMA光解仪中曝光15 min，随后提取菌悬液核酸并进行ddPCR检测，每组试验重复3次。

2）PMAxx暗处理时间的优化：取100 μL的LM死菌悬液（3×10^5 CFU/mL）至1.5 mL离心管中，同时取100 μL的LM活菌悬液作为对照组，根据确定的最佳终浓度添加PMAxx，对暗处理时间进行优化。分别于200 r/min暗处理一定时间（0、5、10、15、20 min）后，将离心管置于PMA光解仪中曝光15 min，提取菌液核酸并进行ddPCR检测，每组试验重复3次。

3）PMAxx曝光时间的优化：根据确定的PMAxx最佳终浓度和暗处理时间，对PMAxx曝光时间进行优化。取100 μL的LM死菌悬液（3×10^5 CFU/mL）至1.5 mL离心管中，同时取100 μL的LM活菌悬液作为对照组，根据确定的最佳终浓度添加PMAxx，根据最佳暗处理时间于

200 r/min进行暗处理，分别将离心管置于PMA光解仪中曝光0、2、5、10、15、20 min，提取菌液核酸并进行ddPCR检测，每组试验重复3次。

1.3.4　PMAxx-ddPCR检测方法准确性验证

将3×10^5 CFU/mL的活菌悬液与死菌悬液按照不同体积比进行混合，分别配制成活/死菌体积比为0∶1、1∶9、1∶1、1∶0的菌悬液，分别取100 μL菌悬液按已优化的PMAxx反应条件进行处理，每个比例设置3个平行，对照组为未经PMAxx处理的菌悬液。最后提取细菌基因组DNA，进行3次ddPCR检测，并与平板计数法结果进行比较。

1.3.5　PMAxx-ddPCR检测方法的特异性、灵敏性试验

分别以斯氏李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌、阪崎肠杆菌、LM的基因组DNA为模板，ddH_2O作为空白对照，进行LM的PMAxx-ddPCR检测方法的特异性试验。

将LM菌悬液逐级10倍稀释制得菌液浓度分别为3.0×10^6、3.0×10^5、3.0×10^4、3.0×10^3、3.0×10^2、3.0×10^1、3.0×10^0 CFU/mL的菌悬液，并对3.0×10^2 CFU/mL的菌悬液进行2倍稀释（1.5×10^2 CFU/mL）和4倍稀释（7.5×10^1 CFU/mL），最后进行PMAxx-ddPCR检测方法的灵敏性试验。按照公式（1）将ddPCR的检测结果换算成菌悬液浓度。

$$C = A \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \quad (1)$$

式中：

C——菌悬液浓度，CFU/mL；

A——ddPCR反应体系（20 μL）中的拷贝数；

V_1——核酸提取时的定容体积，μL；

V_2——ddPCR反应体系中的核酸模板体积，μL；

V_3——菌液体积，mL。

1.3.6　PMAxx-ddPCR检测方法的应用

无菌称取奶酪棒（根据GB 4789.30—2016[11]进行LM检测，结果为未检出）25 g，加入缓冲蛋白胨水225 mL和LM活菌悬液，使其污染水平分别为3×10^3、3×10^4、3×10^5 CFU/mL，每个污染水平设置2个平行，同时加入3×10^5 CFU/mL的LM死菌悬液，充分混匀。取100 μL混菌悬液，加入PMAxx，处理后用细菌基因组DNA试剂盒进行核酸提取，然后进行ddPCR检测，每组重复3次，并与平板计数法的结果进行比较。

从超市和农贸市场购买17份金针菇和16份火腿肠。每份样品各称取25 g，加入李氏增菌肉汤225 mL，拍打混匀。于30 ℃培养箱中培养24 h，吸取100 μL培养液进行PMAxx-ddPCR检测，并与平板计数法的结果进行比较。

1.4　统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析，2组数据比较使用t检验；对3组及以上的比较采用方差分析，$P<0.05$代表差异显著，$P>0.05$为差异不显著。采用Origin 2021软件制图。

2　结果与讨论

2.1　PMAxx终浓度、暗处理时间和曝光时间的优化结果

PMAxx在不同反应条件下对活菌与死菌的作用效果不同。PMAxx的浓度直接影响其在细菌细胞中的结合效率，浓度过高可能会抑制活菌DNA扩增，浓度过低则不能充分抑制死菌DNA扩增。适当的暗处理时间有助于PMAxx与死菌DNA结合，提高检测的准确性和特异性。较短的曝光时间可能导致PMAxx无法对死菌DNA进行完全修饰，过长的曝光时间则可能导致PMAxx与活菌DNA非特异性结合，最终影响检测结果的准确性[21]。因此，筛选最佳的PMAxx终浓度、暗处理时间和曝光时间对于准确检测活菌尤为重要。

由图1（a）可知，当PMAxx终浓度为10 μmol/L时，死菌悬液浓度对数值变化明显，活菌悬液密度对数值变化最小，因此确定10 μmol/L作为PMAxx的最佳终浓度。同理，PMAxx的最佳暗处理时间和曝光时间均为10 min，见图1（b）~（c）。

2.2　PMAxx-ddPCR检测方法的准确性验证结果

为验证使用PMAxx与ddPCR联合检测的准确性，将活菌悬液与死菌悬液按体积比0∶1、1∶9、1∶1、1∶0进行混合，提取核酸，分别用ddPCR方法、PMAxx-ddPCR检测方法、平板计数法进行检测。如图2所示，无论活/死菌体积比如何变化，ddPCR方法的活菌悬液浓度对数

值都较稳定。当活/死菌体积比为 1∶0 时，ddPCR 方法、平板计数法、PMAxx-ddPCR 检测方法的检测结果无显著差异（P>0.05）。当活/死菌体积比为 0∶1、1∶9、1∶1 时，ddPCR 方法与平板计数法、PMAxx-ddPCR 检测方法相比，其检测结果都有显著差异（P<0.05）。当活/死菌体积比为 0∶1 时，这 3 种方法的检测结果之间的差异均显著（P<0.05），这可能是因为 PMAxx 对死菌 DNA 的抑制不彻底，导致 ddPCR 仍能对残留的 DNA 进行扩增。因此后续欲通过 PMAxx 染料与其他试剂联用的方式，实现对死菌 DNA 扩增的完全抑制，同时又不影响活菌检测结果。当活/死菌体积比为 1∶9、1∶1、1∶0 时，PMAxx-ddPCR 检测方法与平板计数法的检测结果无显著差异（P>0.05），说明 PMAxx 可有效抑制死菌 DNA 的扩增，对活菌 DNA 的扩增影响较小，即采用 PMAxx-ddPCR 检测方法能有效区分体系中的活菌和死菌，选择性扩增活菌 DNA，而单独的 ddPCR 检测方法由于无法区分活菌和死菌的 DNA，导致检测结果偏高。

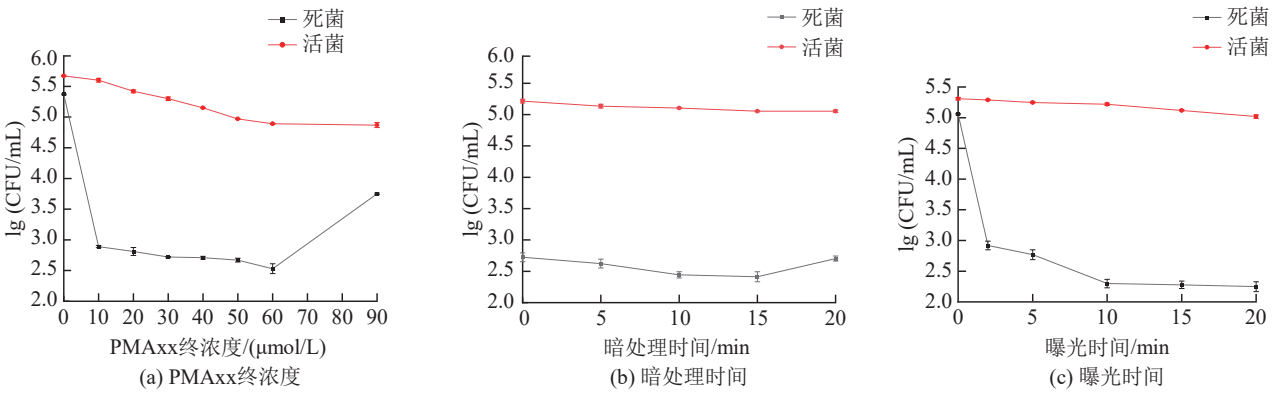
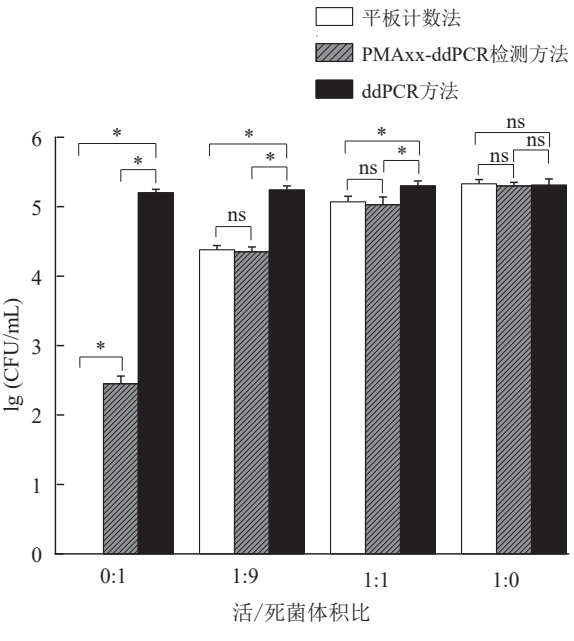


图 1　PMAxx 终浓度、暗处理时间、曝光时间的优化结果

Fig. 1　Optimization results of final PMAxx concentration, dark treatment time, and exposure time



*—P<0.05；ns—P>0.05。

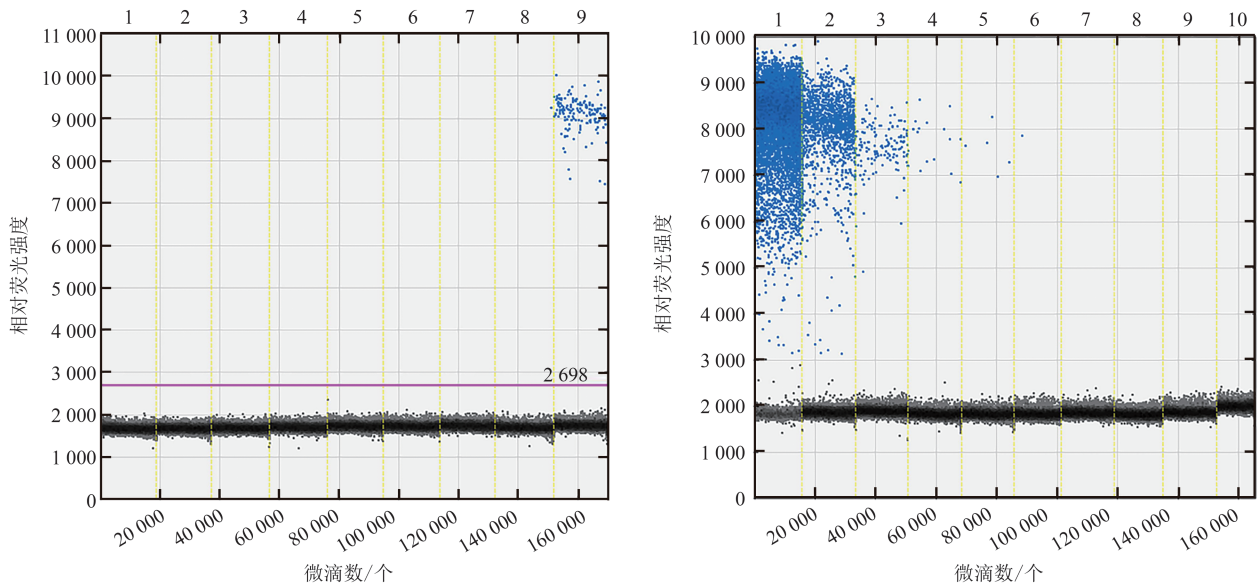
图 2　不同比例 LM 活菌的 3 种方法检测结果

Fig. 2　Detection results of different ratios of viable LM by three methods

2.3　PMAxx-ddPCR 检测方法的特异性、灵敏性试验结果

由图 3（a）可知，空白对照及 7 株非目的菌株均未出现阳性扩增，而 LM 基因组 DNA 能被 ddPCR 检测到，表明所建立的 PMAxx-ddPCR 检测方法特异性良好。

如图 3（b）和表 2 所示，PMAxx-ddPCR 检测方法在 1.5×10^2～3.0×10^6 CFU/mL 均有阳性微滴产生，且 RSD 均小于 20%。而 7.5×10^1 CFU/mL 未出现阳性微滴。因此，PMAxx-ddPCR 检测方法的最低检测限为 1.5×10^2 CFU/mL，定量限为 147 CFU/mL，RSD 小于 20%，说明该检测方法重复性较好。赵丽等[29]结合双抗体夹心技术建立了 LM 液相芯片的检测方法，该方法可检测到 1×10^3 CFU/mL 的病原菌。柯振华[24]利用 PMA 结合荧光定量 PCR 方法对 LM 进行检测，该方法检出限可达到 1×10^3 CFU/mL。程逸宇等[30]建立的数字 PCR 方法可定量检测 5.0×10^3 CFU/mL 的 LM。上述研究中的检测方法，其灵敏性均低于本研究。



1—空白对照；2—伊氏李斯特氏菌；3—英诺克李斯特氏菌；4—斯氏李斯特氏菌；5—副溶血弧菌；6—阪崎肠杆菌；7—金黄色葡萄球菌；8—大肠杆菌；9—LM基因组DNA。

(a) 特异性

1—3.0×10⁶ CFU/mL；2—3.0×10⁵ CFU/ mL；3—3.0×10⁴ CFU/mL；4—3.0×10³ CFU/mL；5—3.0×10² CFU/mL；6—1.5×10² CFU/mL；7—7.5×10¹ CFU/mL；8—3.0×10¹ CFU/ML；9—3.0×10⁰ CFU/mL；10—空白对照。

(b) 灵敏性

图 3　PMAxx-ddPCR 检测 LM 的特异性、灵敏性试验结果

Fig. 3　Specificity and sensitivity of PMAxx-ddPCR for the detection of LM

表 2　PMAxx-ddPCR 检测方法的灵敏度试验结果

Table 2　Sensitivity of PMAxx-ddPCR for the detection of LM

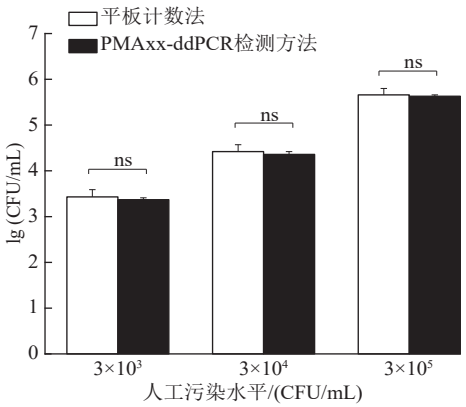
序号	菌悬液浓度/（CFU/mL）	ddPCR 定量检测结果/（CFU/mL）				RSD/%
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
1	3.0×10^{6}	1 732 000	1 688 000	1 764 000	1 728 000	2.21
2	3.0×10^{5}	163 000	174 000	181 800	172 933	5.46
3	3.0×10^{4}	16 600	16 800	15 200	16 200	5.38
4	3.0×10^{3}	1 640	1 920	1 800	1 787	7.86
5	3.0×10^{2}	220	240	280	247	12.39
6	1.5×10^{2}	120	160	160	147	15.75
7	7.5×10^{1}	—	—	—	—	—
8	3.0×10^{1}	—	—	—	—	—
9	3.0×10^{0}	—	—	—	—	—

注：“—”表示未检测到。

2.4　PMAxx-ddPCR 检测方法的应用

在同时存在活菌与死菌的情况下，用平板计数法和 PMAxx-ddPCR 检测方法对不同污染程度的奶酪棒样品进行检测，见图 4。当污染水平在 3×10^{3}、3×10^{4}、3×10^{5} CFU/mL 时，平板计数方法和 PMAxx-ddPCR 检测方法的结果均无显著差异（P>0.05）。

分别通过 PMAxx-ddPCR 检测方法和平板计数法对金针菇和火腿肠样品进行 LM 活菌检测，见表 3。在 17 份金针菇样品中，2 种方法均检出 7 份阳性样品，且定量结果均没有显著差异（P>0.05）；在 16 份火腿肠样品中，2 种方法均未检出 LM。



ns—P>0.05。

图 4 PMAxx-ddPCR 检测方法的应用结果

Fig. 4 Application results of PMAxx-ddPCR detection method

表 3 平板计数法及 PMAxx-ddPCR 检测方法对金针菇阳性样品中 LM 活菌的检测结果

Table 3 Detection results of plate counting and PMAxx-ddPCR detection method for viable LM in positive enoki mushroom samples

样品	平板计数法菌悬液浓度对数值/lg（CFU/mL）	PMAxx-ddPCR检测方法的菌悬液浓度对数值/lg（CFU/mL）	t值	P值
金针菇 1	3.96±0.03	3.92±0.02	1.433	>0.05
金针菇 2	2.67±0.09	2.56±0.09	2.151	>0.05
金针菇 3	5.10±0.04	5.05±0.04	1.878	>0.05
金针菇 4	3.40±0.10	3.28±0.08	2.160	>0.05
金针菇 5	3.01±0.07	2.96±0.04	1.699	>0.05
金针菇 6	3.16±0.08	3.08±0.06	2.208	>0.05
金针菇 7	2.62±0.04	2.51±0.03	2.082	>0.05

3 结论

与 GB 4789.30—2016 中的检测方法相比，ddPCR技术更简单，且能够准确定量食品中的LM，但由于普通ddPCR技术难以区分样品中的活菌与死菌，在进行实际样品检测时易造成结果偏高。因此，作者利用PMAxx结合ddPCR技术有效解决了上述问题，为食品中LM活菌的检测提供了新方法。通过筛选PMAxx的最佳终浓度、最佳暗处理时间和最佳曝光时间，建立了一种基于PMAxx结合ddPCR技术进行食品中LM活菌的定量检测方法，可以准确、高效地实现LM活菌的选择性定量检测，为食源性LM监测提供快速、准确和可靠的技术方法，在食品安全监管中具有一定的应用前景。

参考文献

[1] 马红梅，马臣杰，岳苑，等. 单增李斯特菌感染RAW264.7细胞转录组差异表达分析[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(6)：38-48.
MA H M，MA C J，YUE Y，et al. Comparative analysis of transcriptome differential expression in RAW264.7 cells infected by *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(6)：38-48.(in Chinese)

[2] QUEREDA J J，MORÓN-GARCÍA A，PALACIOS-GORBA C，et al. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*：a trip from environmental to medical microbiology[J]. Virulence，2021，12(1)：2509-2545.

[3] MATLE I，MBATHA K R，MADOROBA E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products：epidemiology，virulence factors，antimicrobial resistance and diagnosis[J]. Onderstepoort Journal of Veterinary Research，2020，87(1)：a1869.

[4] ZHU Q，GOONERATNE R，HUSSAIN M A. *Listeria monocytogenes* in fresh produce：outbreaks，prevalence and contamination levels[J]. Foods，2017，6(3)：21.

[5] IANNETTI L，ACCIARI V A，ANTOCI S，et al. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy：prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese[J]. Food Control，2016，68：55-61.

[6] 连凯，叶舒扬，殷月兰，等. 分子分型方法在单核细胞增生性李斯特菌流行病学研究中的应用[J]. 中国人兽共患病学报，2015，31(8)：757-762.
LIAN K，YE S Y，YIN Y L，et al. Applications of molecular typing methods to the epidemiology of *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Journal of Zoonoses，2015，31(8)：757-762.(in Chinese)

[7] SCHULZ L M，KONRATH A，RISMONDO J. Characterisation of the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in *Listeria* synthetic media[J]. Environmental Microbiology Reports，2023，15(6)：669-683.

[8] 何源，邓辉，王文斟，等. 2020—2022年重庆市食源性单核细胞增生李斯特菌流行状况及耐药研究[J]. 现代预防医学，2023，50(24)：4532-4536.
HE Y，DENG H，WANG W Z，et al. Epidemic status and

drug resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*, Chongqing, 2020—2022[J]. Modern Preventive Medicine, 2023, 50(24): 4532-4536.(in Chinese)

[9] LECLERCQ A, TOURDJMAN M, MATTHEUS W, et al. Outbreak of listeriosis associated with consumption of vegan cheese[J]. The New England Journal of Medicine, 2024, 390(15): 1439-1440.

[10] CHEN P C, CHENG F Z, HUANG Q, et al. Distribution and antimicrobial resistance characterization of *Listeria monocytogenes* in poultry meat in Jiading district, Shanghai[J]. Journal of Food Protection, 2024, 87(3): 100234.

[11] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验: GB 4789.30—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[12] LEE S Y, KIM U, KIM Y, et al. Enhanced detection of *Listeria monocytogenes* using tetraethylenepentamine-functionalized magnetic nanoparticles and LAMP-CRISPR/Cas12a-based biosensor[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1281: 341905.

[13] 俞佳, 岑叶平, 江玲丽, 等. 常见食源性病原菌的快速检测技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(2): 123-133.
YU J, CEN Y P, JIANG L L, et al. Research progress in rapid detection techniques for common foodborne pathogens[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2024, 40(2): 123-133.(in Chinese)

[14] 秦爱, 刘明明, 邓方进, 等. 重组酶介导等温核酸扩增技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(10): 278-286.
QIN A, LIU M M, DENG F J, et al. Application of recombinase aided amplification in the detection of foodborne pathogens[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(10): 278-286.(in Chinese)

[15] 陈鹄. 基于Rti-LAMP非预增菌高灵敏检测食源性致病菌活菌样品前处理方法研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2021.

[16] 谢雨龙, 覃巧思, 李佳连, 等. 3种快速检测柳州螺蛳粉中热损伤沙门氏菌方法的比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 529-534.
XIE Y L, QIN Q S, LI J L, et al. Comparative analysis of 3 rapid detection methods for thermal injury *Salmonella* in Liuzhou snail of rice noodle[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(2): 529-534.(in Chinese)

[17] 陈莉, 徐保平. 儿童肺部孢子菌感染的诊治进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2024, 39(2): 98-103.
CHEN L, XU B P. Advances in the diagnosis and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in children[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2024, 39(2): 98-103.(in Chinese)

[18] 王金凤, 高雅欣, 姜彦芬, 等. 溶血曼氏杆菌微滴式数字PCR定量检测方法的建立及应用[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(1): 74-81.
WANG J F, GAO Y X, JIANG Y F, et al. Development and application of droplet digital PCR for quantification of *Menobacterium hemolyticum*[J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(1): 74-81.(in Chinese)

[19] 吴海江, 孙玉萍, 范田丽, 等. EMA结合实时荧光PCR方法检测单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(11): 65-70.
WU H J, SUN Y P, FAN T L, et al. Detection of live *Listeria monocytogenes* by EMA-qPCR[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(11): 65-70.(in Chinese)

[20] 张德福, 高乐, 张明, 等. 分子生物学技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 368-377.
ZHANG D F, GAO L, ZHANG M, et al. Research progress of molecular biological technology in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 368-377.(in Chinese)

[21] 陶怡君, 谌志筠, 何秋水. 叠氮溴化丙锭结合qPCR检测与区分活菌和死菌的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(6): 63-68.
TAO Y J, CHEN Z Y, HE Q S. Advances in detection and differentiation of live and dead bacteria by PMA-qPCR technology[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2020, 48(6): 63-68.(in Chinese)

[22] 张静, 陈曦, 王彬, 等. 改良单叠氮丙啶-荧光定量PCR法的建立及其检测抗结核药物活性的价值[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(5): 472-480.
ZHANG J, CHEN X, WANG B, et al. Establishment of modified propidium monoazide (PMAxx)-quantitative

PCR assay and its application for identification of antituberculosis drug activity[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2020, 42(5): 472-480.(in Chinese)

[23] 佟利惠,杨敏,赵峰,等. 超高压处理对牡蛎中GII.4型诺如病毒的消减控制[J]. 中国食品学报,2022,22(8):127-135.
TONG L H, YANG M, ZHAO F, et al. Inactivation effect of high hydrostatic pressure on GII.4 norovirus in oysters[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 127-135.(in Chinese)

[24] 柯振华. 叠氮丙啶-实时荧光聚合酶链式反应-高通量测序技术鉴定冷链食品中多种病原菌[J]. 食品安全质量检测学报,2024,15(5):85-96.
KE Z H. Identification of multiple pathogens in cold chain foods by propidium monoazide-real time fluorescent polymerase chain reaction-high throughput sequencing technology[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024,15(5):85-96.(in Chinese)

[25] HAN S N, JIANG N, LV Q Y, et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp.*michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR[J]. PLoS One,2018,13(5):e0196525.

[26] MU D, ZHOU D G, XIE G Y, et al. Real-time recombinase-aided amplification with improved propidium monoazide for the rapid detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk[J]. Journal of Dairy Science,2022,105(2):1028-1038.

[27] 李晓菁,张思雨,刘迪,等. 芸薹根肿菌活细胞PMAxx-qPCR快速定量检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学,2022,55(10):1938-1948.
LI X J, ZHANG S Y, LIU D, et al. Establishment and application of rapid quantitative detection of viable *Plasmodiophora brassicae* by PMAxx-qPCR method[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(10): 1938-1948.(in Chinese)

[28] 魏茂琳,姜彦芬,韩钦,等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌ddPCR定量检测方法的建立及应用[J]. 中国口岸科学技术,2023,5(11):81-89.
WEI M L, JIANG Y F, HAN Q, et al. Establishment and application of a ddPCR method for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods[J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(11): 81-89.(in Chinese)

[29] 赵丽,蔡阳,黄伟,等. 单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法的建立[J]. 现代食品科技,2014,30(4):296-300,267.
ZHAO L, CAI Y, HUANG W, et al. Establishment of a liquidchip method for *Listeria monocytogenes* detection[J]. Modern Food Science and Technology, 2014,30(4):296-300,267.(in Chinese)

[30] 程逸宇,冯秋实,吴海晶,等. 微滴数字PCR定量检测乳制品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 中国乳品工业,2019,47(12):37-40.
CHENG Y Y, FENG Q S, WU H J, et al. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products by droplet digital PCR[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(12):37-40.(in Chinese)

（责任编辑：闫林红）