

基于 MALDI-TOF MS 技术对李斯特氏菌属 两种细菌的快速鉴定

王鸣秋¹, 黄茜¹, 马弋¹, 刘艳¹, 朱必婷¹, 鲍俊旺², 邵翠翠¹, 张莉¹

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 湖北武汉 430075) (2. 大冶市公共检验检测中心, 湖北大冶 435100)

摘要: 为提高基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 在李斯特氏菌属鉴定中的分辨能力, 建立快速准确鉴定单增和英诺克李斯特氏菌的质谱学方法。通过采集 79 株单增和 57 株英诺克李斯特氏菌的指纹图谱, 利用 ClinPro tools 软件对数据进行统计学分析, 建立数学判别模型并验证其准确性。峰统计结果显示, 两组数据峰强度差异显著的特征峰有 16 个, 推测出单增李斯特氏菌生物标志物 6 个, 英诺克李斯特氏菌 10 个, 发现在单增李斯特氏菌中质量峰 3985/7970 u 和 3972/7942 u 是独立且连锁存在。基于遗传算法的判别模型交叉验证率和检测识别能力最强, 分别为 99.44% 和 100.00%, 经验证准确率达到 96% 以上, 可实现对单增和英诺克李斯特氏菌的快速准确鉴定。同时, 利用 Bruker Biotyper 软件将以上菌株建库形成了实验室内部李斯特氏菌谱库, 对 8 株未测李斯特氏菌进行搜库鉴定, 匹配分数均高于商品化数据库, 提升了 MALDI-TOF MS 对李斯特氏菌属的自动鉴定能力。

关键词: 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS); 单核细胞增生李斯特氏菌; 英诺克李斯特氏菌; 判别模型; 内部数据库

文章编号: 1673-9078(2019)11-254-260

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.11.035

Rapid Identification of *L. monocytogenes* and *L. innocua* Based on MALDI-TOF MS

WANG Ming-qi¹, HUANG Qian¹, MA Yi¹, LIU Yan¹, ZHU Bi-ting¹, BAO Jun-wang², SHAO Cui-cui¹,
ZHANG Li¹

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China)

(2. Daye Public Inspection and Test Centre, Daye 435100, China)

Abstract: To improve the discrimination ability of MALDI-TOF MS in identifying *Listeria* species, the objective of this work was to establish a rapid and accurate MS method to discriminate *L. monocytogenes* and *L. innocua*. Protein mass spectra of 79 verified *L. monocytogenes* and 57 *L. innocua* strains were generated using MALDI-TOF MS and subsequently analyzed with ClinPro tools software for specific biomarker identification and discrimination model establishment. The results of peak statistic showed that 16 specific peaks with significant difference were identified, including 6 *L. monocytogenes* and 10 *L. innocua* specific biomarker candidates, respectively. It was found that the mass peaks 3985/7970 u and 3972/7942 u in *Listeria monocytogenes* were independent and linked. Furthermore, the discrimination model based on genetic algorithm presented better cross validation (99.44%) and recognition capability (100.00%), and correct classified rate could reach above 96%, which can obtain the rapid and accurate identification for *L. monocytogenes* and *L. innocua*. Meanwhile, main spectra of a defined collection of these strains were compiled using Bruker Biotyper software and added to an in-house reference library. Evaluation of this library with 8 untested *Listeria* strains yielded improved score values, which were higher than that of commercial database. Application of the in-house database can improve the automatic identification capability of MALDI-TOF MS for *Listeria* species.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); *Listeria monocytogenes*; *Listeria innocua*; discrimination model; in-house database

收稿日期: 2019-06-30

基金项目: 湖北省食品质量安全监督检验研究院自主立项科研项目 (ZZLX2018005)

作者简介: 王鸣秋(1986-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 张莉(1978-), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 食品质量安全检测与管理

李斯特氏菌属(*Listeria*)为革兰氏阳性菌,可存活于高盐和低温环境中^[1]。目前,该属中已发现17种细菌^[2],包括单核细胞增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、英诺克李斯特氏菌(*L. innocua*)、威氏李斯特氏菌、伊氏李斯特氏菌等。其中,只有单增李斯特氏菌和伊氏李斯特氏菌具有致病性,而通常只有单核细胞增生李斯特氏菌可引起人的李斯特氏菌病,孕妇、新生儿、老年人和免疫缺陷者是其易感人群^[3]。单增李斯特氏菌以家畜、家禽为主要宿主,容易污染肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等食品而引起食物中毒和暴发^[4],死亡率可高达20%~30%^[5]。据美国食药监统计,食品中单增污染水平居高不下,由此引起的食品召回和销毁给食品工业造成了巨大的经济损失^[6]。因此,李斯特氏菌的检测对临床治疗和保障食品安全具有非常重要的意义。

食品检测实验室一般基于细菌形态学、生化特征^[7]、血清学^[8]等方法区分单增李斯特氏菌和其他李斯特氏菌,该方法结果准确可靠,但费时费力^[9,10]。而基于分子生物学的鉴定方法虽然能够快速得到结果,但假阳性偏高^[11]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)近年来已经成为一种快速、可靠的微生物鉴定工具,广泛应用于临床和食品检测领域^[12-14]。它通过采集2 ku~20 ku区间的微生物蛋白指纹图谱,与数据库中标准图谱进行比对,经过统计学分析获得匹配分值,从而判定细菌的种属^[15]。虽然国内外均有利用该技术对李斯特氏菌属和单增李斯特氏菌鉴定和分型的报道,但大都基于标准数据库的图谱比对,且各研究报道的特征峰都不尽相同^[11,16-20]。Barbuddhe等^[19]通过加权模式匹配分析方法成功鉴定了李斯特氏菌属五种相近细菌,但Farfour等^[16]则认为MALDI-TOF MS只能实现李斯特氏菌属水平的鉴定;国内龚艳清等^[11]利用MALDI-TOF-MS快速、可靠地区分了单增、绵羊、英诺克、威尔斯和格氏李斯特氏菌,王耀等^[20]应用37株单增李斯特氏菌分离株自建库,并用标准菌株验证其鉴定可信度极高。李斯特氏菌属细菌亲缘关系很近,特别是单增李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌,典型生化反应基本相同^[21],直接运用商品化数据库对未知菌进行鉴定,两者匹配分值均在可信范围,无法得到准确的种水平上的鉴定结果。

因此,本研究利用实验室保藏的单增李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌标准菌株和野生株,获得其指纹图谱,通过软件统计分析寻找生物标志物,建立数学判别模型,实现对未知李斯特氏菌的快速准确鉴定;同

时建立实验室内部李斯特氏菌谱库,整合至现有的商品化数据库中,提升MALDI-TOF MS对李斯特氏菌的自动鉴定能力。

1 材料与方法

1.1 菌株

共136株供试菌株为本实验室保藏的食品分离株和标准菌株。其中标准菌株为单增李斯特氏菌 ATCC 19115,英诺克李斯特氏菌 ATCC 33090;食品分离株包括79株单增李斯特氏菌和57株英诺克李斯特氏菌,来源于猪肉、整鸡或牛肉样本,于2018年6月至2019年2月期间获得。所有菌株均经过全自动微生物生化仪(bioMérieux)和PCR鉴定(*prs*^[22]、*prfA*^[23]和*lin0464*^[24]基因)确认,并进行唯一性编号。

1.2 试剂与设备

含0.6%酵母膏的胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE),北京陆桥;α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA)、肽蛋白标准品BTS,德国布鲁克公司;甲酸、三氟乙酸,美国Fisher公司;乙腈,德国默克公司;检测样品配制基质的标准溶剂为乙腈:水:三氟乙酸(V/V 50:47.5:2.5),基质溶液(用标准溶剂将基质配成饱和溶液)。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(Autoflex)、FlexControl 3.4软件、MALDI Biotyper 4.0软件、FlexAnalysis 3.4软件、ClinPro tools 3.0软件,德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株准备

将冻存于-80℃的实验菌株复苏活化后,划线接种于TSA-YE琼脂培养基,36℃培养24h。

1.3.2 MALDI-TOF-MS 谱图采集

挑取3~5个新鲜菌落,加入装有300 μL 无菌超纯水的1.5 mL离心管中,涡旋混匀,加入900 μL 无水乙醇,混匀,13000 r/min离心2 min,弃上清,室温干燥5 min至乙醇挥发完全。加入20 μL 70%甲酸,涡旋混匀,再加入20 μL 乙腈,混匀,13000 r/min离心2 min。取1 μL 上清液,点样至靶板,每个样品点8个靶位。待自然晾干后,覆盖1 μL 基质溶液HCCA于每个靶点上,自然干燥。同时点1 μL 标准品BTS用于仪器校准。

MALDI-TOF MS 仪器参数设置:线性正离子模式;检测范围2000~20000 u;激光轰击数500,频率

1000 Hz; 离子源电压: 离子源 1 电压 19.5 kV, 离子源 2 电压 18.3 kV, lens 电压 7.5 kV; 激光能量 30%~40%。利用 FlexControl 中 Auto Execute 选项自动获取谱图, 每个靶点采集 3 张谱图, 每个样品共获得 24 张谱图。

1.3.3 数据处理和分析

每个样品选取 3 张谱图, 调入 ClinPro tools 软件进行数据处理和分析。编辑方法参数, 设置谱图处理方法(平滑、均一化、基线扣除、排除无效谱图和噪音谱图、谱峰对齐), 设置峰计算参数(信噪比为 5, 计算峰高)。调入单增李斯特氏菌和英诺克李斯特氏菌两组数据, 进行主成分分析(Principal Component Analysis, PCA), 获得细菌聚类情况, 排除离散样品, 确定用于后续分析的样品数据。将整理好的两组数据进行峰统计分析, 得到两组数据峰差异列表, 寻找两种菌的生物标志物。

1.3.4 判别模型的建立

随机选择两组数据的一部分谱图, 应用 ClinPro Tools 的 3 种统计学算法建立模型, 包括遗传算法(Genetic Algorithm, GA)、监督神经网络算法(Supervised Neural Network, SNN)、快速分类算法(QuickClassifier, QC)。设定算法参数和名称, 进行模型运算、保存模型结果。再利用一部分谱图对 3 组模型进行准确率验证, 最终通过比较交叉验证、识别能力百分数、验证准确率的高低确定最合适的分类判别模型, 并对未测样品进行测试。

1.3.5 建库与鉴定

将 1.3.2 获得的每个样品 24 张谱图调入 MALDI Biotyper 软件, 按照布鲁克公司提供的方法评估图谱质量, 除去低质量的图谱, 建立主谱图(Main Spectrum, MSP), 将新生成的 MSP 添加到新创建的实验室内部数据库中。分别利用商品化菌种库和实验室内部自建库对 8 株未测李斯特氏菌进行鉴定, 菌株活化和处理方式同 1.3.1 和 1.3.2, 分析鉴定结果。

2 结果与讨论

2.1 MALDI-TOF MS 数据分析

研究表明决定数据库质量的不仅仅是菌株的数量, 还包括菌株的异质性, 同种菌株来源越广泛, 分布越分散, 越能够提高数据库鉴定的可靠性^[25]。对于差异分析和寻找生物标志物亦如此。因此, 在进行数据统计分析时首先应该进行聚类分析, 挑选更具代表性的样本参与后续实验。

单增和英诺克李斯特氏菌两组数据经 PCA 分析,

聚类情况如图 1 所示。图 1a 显示, 79 株单增李斯特氏菌被分为不同的集群, 而图 1b 显示 57 株英诺克李斯特氏菌则更加分散。两组数据均存在一些散在分布的点, 不属于任何集群, 这些数据被视为异常值排除^[25], 不参与之后的数据分析。最终, 共选取 75 株单增和 55 株英诺克李斯特氏菌用于峰统计分析、建模和模型验证。

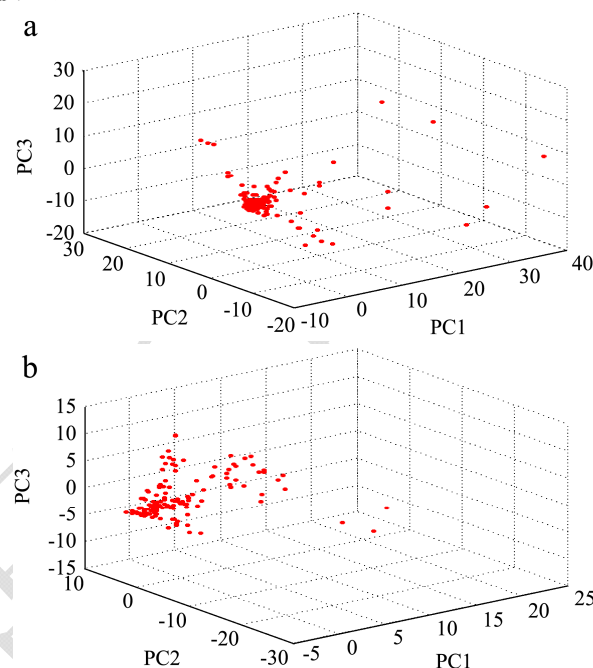
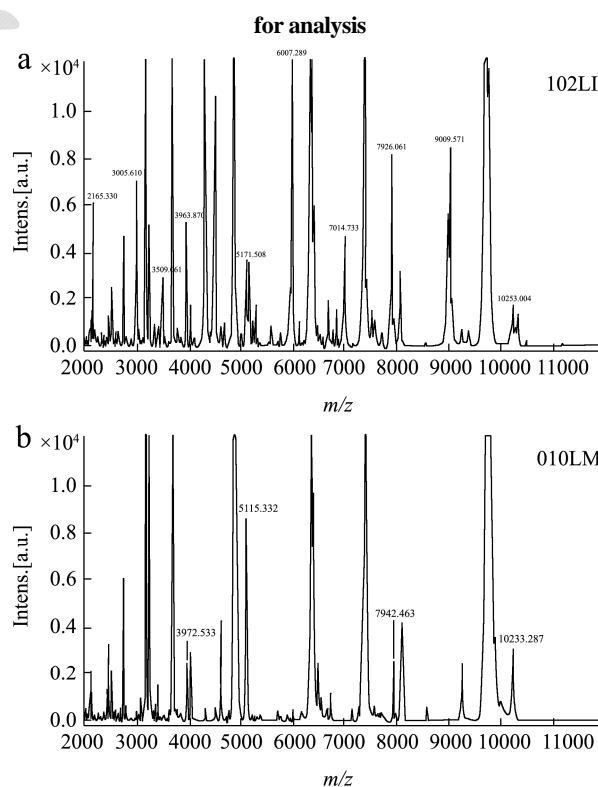


图 1 单增 (a) 和英诺克 (b) 李斯特氏菌 PCA 分析结果

Fig.1 PCA of all *L. monocytogenes* and *L. innocua* strains tested



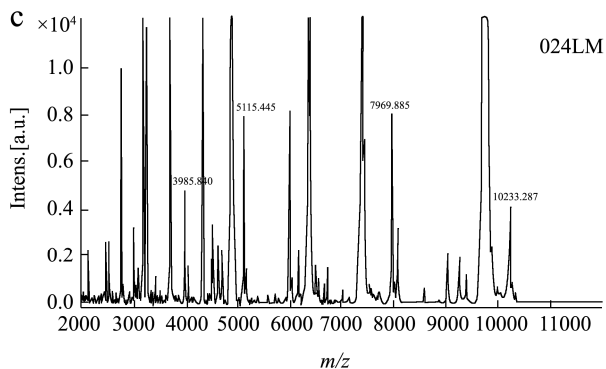


图2 单增和英诺克李斯特氏菌 MALDI-TOF MS 谱图及其特征峰

Fig.2. MALDI-TOF MS spectra of *L. monocytogenes* and *L. innocua* strains and their discriminating peaks

注: a、b、c 分别为编号 102LI 的英诺克李斯特氏菌、编号 010LM 的单增李斯特氏菌、编号 024LM 的单增李斯特氏菌的 MALDI-TOF MS 谱图。

峰统计分析显示, 两组数据峰强度差异显著 ($p < 0.001$) 的质量峰有 16 个 (图 2), 这些质量峰被认为是两种细菌潜在的生物标志物, 其中单增李斯特氏菌 6 个, 英诺克李斯特氏菌 10 个。某些特征峰虽然在其中一组数据的图谱中未被发现, 但也并非存在于所有另一组数据图谱中。因此, 我们统计了每个特征峰在两组数据中的分布比例 (表 1)。

表 1 单增和英诺克李斯特氏菌潜在生物标志物

Table 1 Putative biomarkers for *L. monocytogenes* and *L. innocua*

峰质量数(m/z)	<i>innocua</i>	
	菌株比例%	
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>
2165	0	68.5
3005	0	53.7
3509	0	59.3
3963	0	100
3972/7942	87.1	0
3985/7970	12.9	0
5115	100	0
5171	0	81.5
6006	0	74.1
7014	0	46.3
7926	0	100
9010	0	62.9
10233	100	0
10253	0	94.4

另外, 我们从单增李斯特氏菌数据中发现, 质量峰 3985/7970 u 和 3972/7942 u 是独立且连锁出现的, 即某一样品图谱只存在两组质量峰的其中一组, 且两个峰总是成对出现 (图 3)。其中, 菌株编号为 24、55、

77、102、115、129、143、148、151 的单增李斯特氏菌图谱中存在 3985/7970 u 两个质量峰, 而其他单增菌株则具有 3972/7942 u 两个质量峰。Barbuddhe 等^[19]曾报道过质量峰 7970 u 可区分单增李斯特氏菌 4a/4c 与其他血清型, 因此我们推测以上两组特征峰的连锁出现可能与血清型有关。

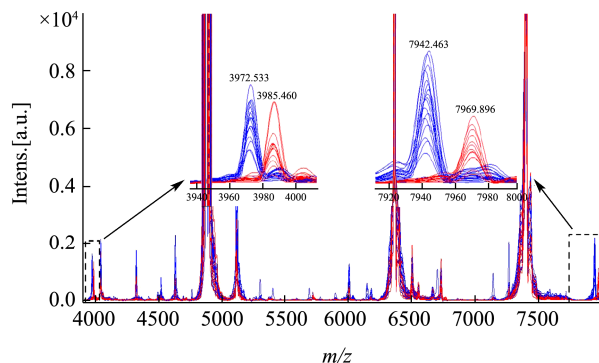


图3 单增李斯特氏菌 MALDI-TOF MS 特征峰 3985/7970 u 和 3972/7942 u

Fig.3 Discriminating peaks 3985/7970 u and 3972/7942 u of *Listeria monocytogenes* analyzed by MALDI-TOF MS

注: 蓝色谱图代表存在 3972/7942 u 特征峰的单增李斯特氏菌, 红色谱图代表存在 3985/7970 u 特征峰的单增李斯特氏菌。

2.2 判别模型的建立

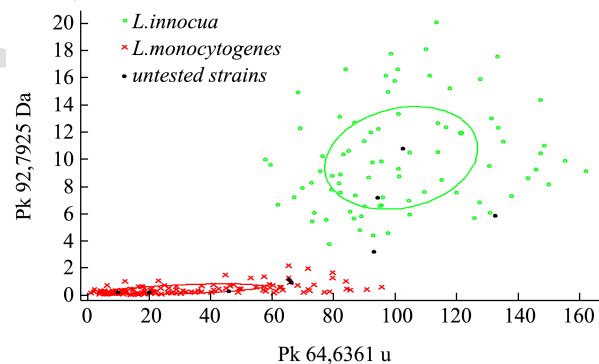


图4 单增和英诺克李斯特氏菌 MALDI-TOF MS 鉴别模型及鉴定结果

Fig.4 MALDI-TOF MS discrimination model of *L. monocytogenes* and *L. innocua* and identification results

利用 ClinPro Tools 软件的 3 种算法对随机选取的 50 株单增李斯特氏菌和 37 株英诺克李斯特氏菌数据建立模型, 结果表明, GA、SNN、QC 算法模型的交叉验证率分别为 99.44%、97.77%、99.31%, 检测识别能力分别为 100%、98.17%、100.00%, 三种模型均具有较好的交叉验证率和识别能力。交叉验证可以衡量模型可靠性、预测模型的性能, 检测识别能力是建立模型的质谱图分类正确率^[26]。再利用 20 株单增和

14株英诺克对已建立的模型进行验证,发现GA模型对单增和英诺克李斯特氏菌的鉴定准确率最高,分别为96.4%和100%,其次为SNN模型,准确率为100%和62.2%,QC算法模型的准确率为100%和56.8%。综合比较,GA算法判别模型在李斯特氏菌鉴定中具有较好的分辨能力,能够对单增和英诺克李斯特氏菌进行有效鉴定。

利用GA算法模型对9株未测李斯特氏菌进行鉴定,其中4株被鉴定为英诺克李斯特氏菌,5株被鉴定为单增李斯特氏菌(图4),与其生化和分子鉴定结果一致。

2.3 改进的实验室内部数据库对实际样品的鉴定验证

2.1中75株单增和55株英诺克李斯特氏菌图谱数据经建库整合至布鲁克商品化数据库中,形成改进的

实验室内部数据库,该库中包含单增李斯特氏菌图谱87张,英诺克李斯特氏菌图谱66张。8株未测试过的李斯特氏菌经过改进的内部数据库测试,均得到可靠的鉴定结果,匹配分数大于2.4,高于商品化数据库匹配分数(表2)。其中编号为171LM、172LM、188LM、189LM的菌株两次测试均被鉴定为单增李斯特氏菌;186LI、187LI、189LI、190LI四株菌商品化数据库匹配分数居前两位的结果不同,186LI和190LI匹配排第二位的分数分别为2.269和2.391,根据布鲁克微生物鉴定得分解释,2.3~3.0分视为完全可靠地鉴定到种水平,2.0~2.299视为鉴定到种的水平,这两个分数都位于可信范围内,但鉴定结果却无法区分究竟是单增李斯特氏菌还是英诺克李斯特氏菌。但经过改进的实验室内部数据库鉴定,这四株菌均得到大于2.4的鉴定分数,且结果明确为英诺克李斯特氏菌,与生化和分子鉴定结果一致。

表2 商品化数据库和改进的实验室内部数据库对未测李斯特氏菌鉴定结果比较

Table 2 Identification scores of unknown *Listeria* strains matched against the Bruker database and the in-house database

菌株	商品化数据库		实验室自建库	
	鉴定分数	鉴定结果	鉴定分数	鉴定结果
171LM	1.969	<i>L.monocytogenes</i>	2.585	<i>L.monocytogenes</i>
172LM	2.044	<i>L.monocytogenes</i>	2.579	<i>L.monocytogenes</i>
188LM	2.057	<i>L.monocytogenes</i>	2.662	<i>L.monocytogenes</i>
189LM	2.070	<i>L.monocytogenes</i>	2.640	<i>L.monocytogenes</i>
186LI	2.423/2.269*	<i>L.innocua/L.monocytogenes</i> *	2.678	<i>L.innocua</i>
187LI	2.063/1.893*	<i>L.innocua/L.monocytogenes</i> *	2.653	<i>L.innocua</i>
189LI	2.019/1.866*	<i>L.innocua/L.monocytogenes</i> *	2.494	<i>L.innocua</i>
190LI	2.451/2.391*	<i>L.innocua/L.monocytogenes</i> *	2.588	<i>L.innocua</i>

注: *表示匹配分数位于前两位,但鉴定结果不同的情况;2.3~3.0分视为完全可靠地鉴定到种水平,2.0~2.299视为鉴定到种的水平,1.7~1.999视为鉴定到属的水平,1.69以下视为不可靠的鉴定。

3 结论

3.1 MALDI-TOF MS技术基于细菌核糖体高表达蛋白的指纹图谱,实现了对细菌属水平、种水平、亚种乃至株水平上的准确快速鉴定^[27,28],但对于一些遗传特性和生化特征及其接近的细菌,如李斯特氏菌属、蜡样芽胞杆菌菌群、志贺氏菌/大肠杆菌、洋葱伯克霍尔德菌等,利用现有的数据库直接鉴定仍然是一种挑战。本研究通过大量不同野生菌的建库,使得现有商品化数据库得到了扩充,提高了对单增和英诺克李斯特氏菌自动鉴定的分辨率和准确度。另外,我们建立的基于GA算法的判别模型具有较强的识别能力和交叉验证,可作为鉴定单增和英诺克李斯特氏菌的辅助方法,实现对两种细菌的快速鉴定。

3.2 一般情况下,能否利用质谱技术成功鉴定微生物取决于三个方面:样品制备、蛋白提取、图谱分析和后续的统计学评价^[29]。特别是对于亲缘关系接近的细菌种类,应用扩展的统计学分析方法更加必要。通过软件和编程实现多样化的数据分析,比如ClinPro tools、Matlab、R语言,能够从复杂的质谱数据中寻找隐藏的物种特异性质谱峰。本研究利用ClinPro tools软件对单增和英诺克李斯特氏菌两组图谱数据的统计分析,发现了16个峰强度显著差异的特征峰,可作为区分两种细菌的生物标志物。后续若能够通过二级质谱对特征蛋白进行进一步指认和鉴定,可为研究单增李斯特氏菌致病机理提供思路 and 方向。除应用于菌株种属鉴定,MALDI-TOF MS结合本研究所使用的分析软件和方法在单增血清型分析,溯源追踪等方

向也可进行进一步的探讨研究。

参考文献

- [1] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis [J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 16(1): 32
- [2] Weller D, Andrus A, Wiedmann M, et al. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov. from food processing environments in the USA [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2015, 65(1): 286-292
- [3] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis [J]. Microbes & Infection, 2007, 9(10): 1236-1243.
- [4] Alessandria V, Rantsiou K, Dolci P, et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(31): s156-s162
- [5] de Noordhout C M, Devleeschauwer B, Angulo F J, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(11): 1073-1082
- [6] Zoz F, Grandvalet C, Lang E, et al. *Listeria monocytogenes*, ability to survive desiccation: Influence of serotype, origin, virulence, and genotype [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 248: 82-89
- [7] Jadhav S, Bhave M, Palombo E A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes* [J]. J Microbiol Methods, 2012, 88(3): 327-341
- [8] Seeliger H P R. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species [M]. Methods in Microbiology, 1979
- [9] Teruyo O K, Naomi Y, Hajime T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria* [J]. Plos One, 2016, 11(7): e0159730
- [10] Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, et al. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 50(3): 1008-1013
- [11] 龚艳清,陈信忠,杨俊萍,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在李斯特菌检测和鉴定中的应用[J].食品科学,2012, 33(6):209-214
GONG Yan-qing, CHEN Xin-zhong, YANG Jun-ping. Detection and identification of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Food Science, 2012, 33(6): 209-214
- [12] Böhme K, Fernández-No I C, Barros-Velaázquez J, et al. Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(6): 3169-3183
- [13] Griffin P M, Price G R, Schooneveldt J M, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant *Enterococci* and investigate the epidemiology of an outbreak [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(9): 2918-2931
- [14] 刘海洪.MALDI TOF MS 在细菌检测和鉴定中的应用[J].微生物学免疫学进展,2003,31(2):47-53
LIU Hai-hong. Application of MALDI TOF MS in bacteria detection and identification [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2003, 31(2): 47-53
- [15] 赵贵明,刘洋,陈颖,等.克罗诺杆菌 MALDI-TOF-MS 数据库的建立及应用[J].食品科学,2014,35(8):105-110
ZHAO Gui-ming, LIU Yang, CHEN ying, et al. Establishment and application of an analytical database for *Cronobacter* spp. by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Food Science, 2014, 35(8): 105-110
- [16] Farfour E, Leto J, Barritault M, et al. Evaluation of the andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing gram-positive bacilli [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(8): 2702-2707
- [17] Jadhav S, Gulati V, Fox E M, et al. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 202: 1-9
- [18] Hsueh P R, Lee T F, Du S H, et al. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(7): 2371-2379
- [19] Barbuddhe S B, Maier T, Schwarz G, et al. Rapid identification and typing of *listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(17): 5402-5407
- [20] 王耀,曹际娟,赵昕,等.单增李斯特氏菌 MALDI-TOF-MS 鉴定与分型研究[J].食品科学,2012,3:194-198

- WANG Yao, CAO Ji-juan, ZHAO Xin, et al. Identification and subtyping of *Listeria monocytogenes* by MALDI-TOF-MS [J]. Food Science, 2012,3: 194-198
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 国家食品药品监督管理总局.GB 4789.30-2016[S].北京:中国标准出版社,2016
- National health and family planning commission of P.R.C, China food and drug administration. GB 4789.30-2016 [S]. Beijing: Standard press of China, 2016
- [22] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3819-3822
- [23] Loff M, Mare L, De Kwaadsteniet M, et al. 3MTM Molecular Detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. [J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 101: 33-43
- [24] Ryu, Jio. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR [J]. Food Control, 2013, 32(2): 659-664
- [25] Pauker V I, Thoma B R, Grass G, et al. Improved discrimination of *Bacillus anthracis* from closely related species in the *Bacillus cereus* sensu lato group based on MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(5): JCM.01900-17
- [26] 闫军,王娉,赵晓美,等.基于 MALDI-TOF/TOF 技术的单增李斯特菌四种血清型的快速鉴别[J].中国农业科技导报,2018,20(10):144-151
- YAN Jun, WANG Pin, ZHAO Xiao-mei, et al. Rapid identification of four serotypes of *Listeria Monocytogenes* using MALDI-TOF/TOF technique [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018, 20(10): 144-151
- [27] Messelhäusser U, Frenzel E, Blöching C, et al. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in bavaria (2007-2013) [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2014, 2014(4): 465603
- [28] Fiedoruk K, Daniluk T, Fiodor A, et al. MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic *Bacillus cereus* group members[J]. Electrophoresis, 2016, 37(15-16): 2235-2247
- [29] Karger, Axel. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases [J]. Proteomics-Clinical Applications, 2016, 10(9-10): 982-993

(上接第 160 页)

- [29] 姜长红,王金庆,王国强.冰温贮藏鸡肉的试验研究[J].食品与机械,2008,24(1):63-67
- JIANG Chang-hong, WANG Jin-qin, WANG Guo-qiang. Experimental research on fresh chicken under controlled freezing-point temperature [J]. Food and Machinery, 2008, 24(1): 63-67
- [30] 许立兴,荆红彭,赵菲,等.冰温贮藏对鸭胸肉品质变化的影响[J].食品科学,2015,36(14):222-227
- XU Li-xing, JING Hong-pen, ZHAO Fei, et al. Quality properties of duck breasts during ice temperature storage [J]. Food Science, 2015, 36(14): 222-227
- [31] 朱迎春,王水晶,马俪珍,等.不同脂肪添加量的牛肉饼在反复冻融过程中的品质变化[J].食品科学,2017,38(11):72-79
- ZHU Ying-chun, WANG Shui-jing, MA Li-zhen, et al. Quality changes of beef patties with different fat contents during multiple freeze-thaw cycles [J]. Food Science, 2017, 38(11): 72-79
- [32] 扈莹莹,王妍,于晶,等.脂肪添加量对发酵香肠脂质和蛋白质氧化及挥发性化合物形成的影响[J/OL].食品科学:1-11 2019-07-01].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190102.1520.063.html>
- HU Ying-ying, WANG Yan, YU Jing, et al. Effect of fat addition level on lipid, protein oxidation and volatile compound formation in fermented sausages [J/OL]. Food Science: 1-11
- [33] Utrear M, Morcuende D, Estévez M. Fat content has a significant impact on protein oxidation occurred during frozen storage of beef patties [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(1): 62-68

(上接第 241 页)

- [21] 于冬梅,何宇纳,郭齐雅,等.2002-2012 年中国居民能量营养素摄入状况及变化趋势[J].卫生研究,2016,45(4):527-533
- YU Dong-mei, HE Yu-na, GUO Qi-ya, et al. Trends of energy and nutrients intake among population 2002-2012 [J]. Health Research, 2016, 45(4): 527-533