

单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光 RPA 检测方法的建立及应用

王金凤^{1,2}, 刘立兵^{1,2}, 耿云云³, 石蕊寒^{1,2}, 孙晓霞^{1,2}, 南汇珠^{1,2}, 姜彦芬^{1,2}, 王建昌^{1,2}

(1. 河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 河北石家庄 050000) (2. 河北省检验检疫科学技术研究院, 河北石家庄 050051) (3. 河北师范大学生命科学学院, 河北石家庄 050024)

摘要: 本研究旨在建立一种快速检测单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 的实时荧光重组酶聚合酶扩增 (real-time RPA) 方法。基于 LMhlyA 基因保守序列, 设计合成特异性 RPA 引物和 exo 探针, 所建立的 LM real-time RPA 方法能够在 37 °C 等温条件下 20 min 内完成扩增。该方法仅对 LM 基因组 DNA 为阳性扩增, 对其它 20 种致病细菌基因组 DNA 的扩增均为阴性; 以 LM 纯培养菌液的基因组 DNA 进行 10 倍列梯度稀释, 并以其作为模板, 其灵敏性可达到 5×10^{-1} pg, 与实验室已建立的 real-time PCR 方法一致。人工污染实验中, 对于 LM 接菌量为 3 CFU/25 g 的羊肉和生菜样品, 增菌 14 h 即可通过建立的 real-time RPA 方法检出, 与传统培养方法和 real-time PCR 检测结果均一致, 但是前者所需时间明显少于后者。本文建立的 LM real-time RPA 方法特异性强, 灵敏性高, 操作简单, 反应迅速, 并能够摆脱对价格昂贵的荧光 PCR 仪和专业实验室的需求, 可应用于食品突发事件中 LM 的现场快速检测, 对保障我国食品安全具有重要意义。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; real-time RPA; hlyA 基因; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2018)08-213-218

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.031

Development and Application of the Real-time Recombinase Polymerase Amplification Assay for Detection of *Listeria monocytogenes*

WANG Jin-feng^{1,2}, LIU Li-bing^{1,2}, GENG Yun-yun³, SHI Rui-han^{1,2}, SUN Xiao-xia^{1,2}, NAN Hui-zhu^{1,2},
JIANG Yan-fen^{1,2}, WANG Jian-chang^{1,2}

(1.Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050000, China)
(2.Hebei Academy of Inspection and Quarantine, Shijiazhuang 050051, China)(3.College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a method for the rapid detection of *Listeria monocytogenes*(LM) by real-time recombinase polymerase amplification (real-time RPA). The primers and exo probe real-time RPA were designed basing on the conserved region of the hlyA gene of LM, and the assay was performed successfully at 37 °C for 20 min. The real-time RPA assay could specifically amplify the genomic DNA of LM, but not other 20 bacteria. Using 10-fold serial dilutions of the genomic DNA of LM, the data showed that the limit of detection of the assay was 5×10^{-1} pg, which was the same as the real-time PCR. In the artificial contamination assays, the *Listeria monocytogenes* could be detected after 14 hours enrichment culture by the real-time RPA for the mutton and lettuce samples, which were inoculated initially with LM at the concentration of 3 CFU/25 g. The detection results of real-time RPA were the same as those of the traditional culture method and real-time PCR, while the reaction time was much less than the latter two assays. The developed real-time RPA assay is highly specific, highly sensitive, rapid, easy to perform, and is independent of the expensive fluorescence thermal cyclers and good laboratory circumstance, which could be applied in the on-site detection of LM in the food safety outbreaks and is of great significance for ensuring the food safety.

Key words: *Listeria monocytogenes*; real-time RPA; hlyA gene; food safety

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目 (2016IK107); 河北师范大学博士基金项目 (130401)

作者简介: 王金凤 (1984-), 女, 兽医师, 主要从事食源性微生物、动物疫病病原的分子生物学检测研究

通讯作者: 王建昌 (1981-), 男, 高级兽医师, 主要从事食源性微生物、动物疫病病原的分子生物学检测研究

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *LM*), 在 2000 年 WHO 食品安全工作计划中, 被列为重点检测的食源性致病菌之一^[1]。蔬菜、乳制品和肉类等食品都已被证实是单增李斯特菌的传播载体^[2]。近几年食品污染物调查结果显示, 单增李斯特菌在生肉及即食食品中污染率较高^[3], 我国散装熟肉制品也具有引起单增李斯特菌病的风险^[4]。*LM* 可诱发食物中毒, 导致李斯特菌病, 主要引起人类脑膜脑炎和菌血症^[5,6], 发病率虽低, 病死率高达 12.8%~17%^[7]。据估计, 在欧洲每年可引起 400 人死亡^[8]。在美国, 李斯特菌病在食源性疾病引起的死亡中占第 3 位, 每年约 1600 人感染李斯特菌病并有 260 人因此死亡^[9]。因此, 单增李斯特菌对人类健康的危害使得对食品中该菌的检测具有重要意义。

目前对食品中 *LM* 的检测方法主要是传统培养方法和分子生物学方法。我国目前对 *LM* 传统培养方法多采用 GB 4789.30-2016^[10], 该方法至少需要 4~5 d (若为阳性, 则需要 7 d) 完成对样品中 *LM* 的检测, 操作繁琐复杂, 并且对检测人员技术要求较高。目前分子生物学技术在食源性致病菌的检测中已经得到了广泛应用^[11]。刘万静等^[12]应用 *LM* Real-time PCR 方法成功的从 134 例风险监测样本中检测出 8 例 *LM* 阳性; 黄朱梁等^[13]建立了实时浊度 LAMP 方法检测食品中 *LM*, 并从 160 份不同种类的食品中检出 5 份阳性样本。Real-time PCR 方法需要 60 min 左右, 且均需要昂贵

的仪器设备, 专业的技术人员, 以及良好的实验室环境; 实时浊度 LAMP 方法反应时间也为 60 min, 无法实现对 *LM* 的快速检测。上述方法对于口岸现场及食品突发事件中对 *LM* 的现场快速检测, 具有一定的局限性。

重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种新的核酸等温扩增技术, 是一种依赖结合单链核酸 (寡核苷酸引物) 的重组酶、单链 DNA 结合蛋白 (SSB) 和链置换 DNA 聚合酶三种核心酶, 对核酸进行特异、灵敏、等温、快速扩增, 对试验设备、人员和资源的要求较低。目前 RPA 技术已广泛应用于转基因大豆^[14], 病毒^[15,16]、细菌^[17,18]和寄生虫^[19]等多种病原的快速检测, 但未见 RPA 方法用于 *LM* 检测的报道。

鉴于此, 本研究基于 *LM* 特异性基因 *hlyA* 的保守区域, 设计特异性 RPA 引物和 *exo* 探针, 建立了快速检测 *LM* 的实时荧光 RPA 方法, 并进行该方法的特异性、灵敏性、人工污染样品验证试验, 为实现 *LM* 的现场快速检测提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

本实验所用菌株见表 1。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains in this study

菌株名称	来源	Real-time RPA	Real-time PCR
单核细胞增生李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	+	+
	CMCC 54004	+	+
	本实验室分离	+	+
	本实验室分离	+	+
英诺克李斯特菌 <i>L.innocua</i>	ATCC 33090	-	-
威尔斯李斯特菌 <i>L.welshimeri</i>	ATCC 35897	-	-
格氏李斯特菌 <i>L.grayi</i>	ATCC 25401	-	-
伊氏李斯特菌 <i>L.Ivanovii</i>	CICC21663	-	-
斯氏李斯特菌 <i>L.seeligeri</i>	CICC21671	-	-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-
大肠埃希氏菌 O157: H7 <i>Escherichia coli</i> O157: H7	CICC21530	-	-
产肠毒素大肠埃希氏菌 <i>E.coli</i> ETEC	CICC 10667	-	-
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	CICC21678	-	-
宋内氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	CICC21679	-	-
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	-	-
都柏林沙门氏菌 <i>Salmonella dublin</i>	CICC 21497	-	-

转下页

接上页

奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	ATCC35659	-	-
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21617	-	-
蜡样芽胞杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	-	-
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	-	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-
马红球菌 <i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 1621	-	-
阪崎肠杆菌 <i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	-
空肠弯曲杆菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	-	-

注：+，阳性结果；-，阴性结果。

1.1.2 主要试剂

TwistAmp™exo kit, 购自英国 TwistDx 公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 购自天根生化科技（北京）有限公司；LB 增菌液, 单核细胞增生李斯特氏菌选择性平板, 均购自北京陆桥技术股份有限公司；Premix Ex Taq, 购自 TAKARA 公司。

1.1.3 主要设备

NanoDrop 2000c 核酸蛋白分析仪, 美国 Thermo 公司；ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司；GenieIII 等温扩增荧光检测系统, 英国

OptiGene Limited 公司。

1.2 方法

1.2.1 探针和引物设计

参考 Genbank 中 *LMhlyA* 基因序列 (HM58959), 根据保守区域设计合成特异性的 real-time RPA 和 real-time PCR 引物探针, 扩增片段分别为 158 bp 和 95 bp。

所有引物和探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成（见表 2）。

表 2 引物和探针序列

Table 2 Primer and probe sequences

方法	引物探针名称	序列 (5'-3')	长度
real-time RPA	LM-RPA-F	TCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTC	158
	LM-RPA-R	GTTACCAGGCAAATAGATGGACGATGTGAAAT	
	LM-RPA-P	CAITTCCTGGGATGAAGTAAATTATGATCC (FAM-dT) GA (THF) GG (BHQ1-dT) AACGAAATTGTTTC-C3 spacer	
real-time PCR	LM-PCR-F	CGCAAAAGATGAAGTTCAAATCA	95
	LM-PCR-R	CTCCTGGTGTTTCTCGATTAAAAGT	
	LM-PCR-P	FAM-CGACGGCAACCTCGGAGACTTACG-Eclipse	

1.2.2 LMreal-time RPA 反应体系和条件

使用 TwistAmpexokit 配制 50 μL RPA 反应体系, 其中包括 LM-RPA-F/R (10 μM) 各 2.1 μL, LM-RPA-P (10 μM) 0.6 μL, Rehydration Buffer 29.5 μL, ddH₂O 12.2 μL, 模板 1 μL, 280 mM MgAc 2.5 μL。实验操作为: 将除去模板和 MgAc 的所有试剂预混后转入含有冻干酶制剂的 0.2 mL 反应管中, 充分混匀; 取 1 μL 模板加入反应管中; 取 2.5 μL MgAc 加在反应管盖中, 盖紧后瞬时离心并涡旋; 置于等温扩增荧光检测系统中, 设置反应条件 37 °C 20 min。

1.2.3 LMreal-time PCR 反应体系和条件

根据本实验室已优化好的反应条件, 配制 25 μL real-time PCR 反应体系, 包括 Premix Ex Taq (包含 PCR buffer、DNA 聚合酶和 dNTPs 等), LM-PCR-F/R (10 μM) 各 1.5 μL, LM-PCR-P (5 μM) 0.8 μL, DNA 模

板 1 μL, ddH₂O 7.7 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 35 s (收集荧光), 35 个循环。

1.2.4 LMreal-time RPA 特异性和灵敏性试验

提取表 1 中 LM 和其它菌株 DNA, 进行 RPA 方法特异性验证试验。将 LM 过夜纯培养, 取 1 mL 菌液使用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 并测定 DNA 浓度。使用灭菌水进行 10 倍梯度稀释, 使其浓度在 5.0×10⁴~5.0×10³ pg/μL 范围, 分别取 1 μL 各稀释浓度 DNA 作为模板进行 RPA 方法灵敏性试验, 确定该方法的最低检测限。同时与 real-time PCR 方法进行灵敏性比较。

1.2.5 LM real-time RPA 重复性实验

将 LM 纯培养物按 10 倍梯度稀释, 随机取 3 个稀释度的样本分别作 5 个重复, 用 real-time RPA 方法进行批内和批间的扩增检测, 同时计算 Ct 值的变异系

数, 评价实验结果的重复性。

1.2.6 人工污染样品的检测

将 *LM* 经过夜纯培养后, 用生理盐水进行 10 倍列稀释, 选取 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释度菌液作平板计数, 计算纯培养物的初浓度。经稀释后, 选取 0~5、20~30、50~100 CFU 范围内的菌量分别添加到 25 g 羊肉、生菜样品 (预先已经 GB 4789.30-2016 检测为 *LM* 阴性, 并经 GB 4789.2-2016 和 GB 4789.3-2016 检测样品中细菌总数和大肠菌群) 中, 再添加 225 mL 的 LB 增菌液, 同时做空白对照, 30 °C 培养。选取 1 mL 前增菌时间分别为 14 h 和 20 h 的培养液, 使用试剂盒进行 *LM* 基因组 DNA 提取, 加 50 μ L ddH₂O 进行溶解, 并取 1 μ L 进行 real-time RPA 检测。同时与 real-time PCR、GB 4789.30-2016 方法进行平行验证, 比较三种方法的检测结果。同时使用 GB 4789.30-2016 方法测定人工污染样品经不同时间前增菌后的 *LM* 数量。

2 结果与讨论

2.1 *LM* real-time RPA 方法的特异性结果

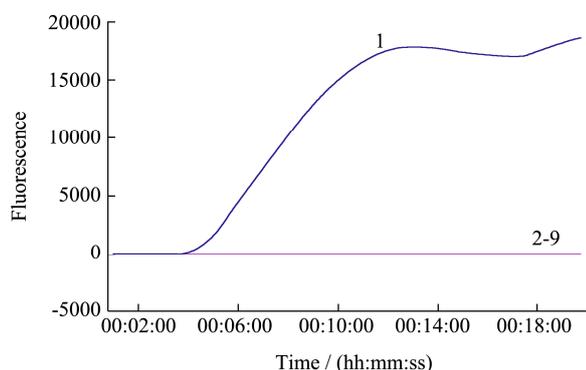


图 1 *LM* real-time RPA 特异性结果

Fig.1 Specific results of real-time RPA for LM

注: 1.单核细胞增生李斯特氏菌; 2.大肠埃希氏菌 O157:H7; 3.阪崎肠杆菌; 4.志贺氏菌; 5.金黄色葡萄球菌; 6.沙门氏菌; 7.蜡样芽孢杆菌; 8.空肠弯曲菌; 9.副溶血性弧菌。

应用所建立的 *LM*real-time RPA 方法对表 1 中标准菌株和分离菌的基因组 DNA 进行特异性扩增, 结果在 20 min 内, 仅有 *LM* 出现特征性荧光扩增曲线, 其余菌株均无扩增曲线。具体结果见表 1。图 1 为部分菌株特异性检测结果。上述结果说明本方法具有良好的特异性。

2.2 *LM* real-time RPA 方法的灵敏性结果

经 NanoDrop 2000c 核酸蛋白分析仪测定, 所提取的细菌基因组 DNA 浓度为 5×10^4 pg/ μ L。经 10 倍列梯度稀释至浓度 5×10^{-3} pg/ μ L, 以此作为模板进行

*LM*real-time RPA 和 real-time PCR 灵敏性检测, 结果如图 2 所示。当 DNA 浓度为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^{-1}$ pg 时, real-time RPA 均出现明显的扩增曲线, 且 TT 值在 2:30~7:12 之间, 说明所建立方法的检出限为 5×10^{-1} pg (图 2a)。同 real-time PCR 结果相比, 两种方法的灵敏性一致, 均可检测到 5×10^{-1} pg (图 2b)。就检测时间而言, real-time RPA 仅需要 2:30~7:12 就可实现对 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^{-1}$ pg 基因组 DNA 的检测, 而 real-time PCR 则需要约 25~55 min (Ct 值在 15.32~31.70 之间)。具体结果见表 3。

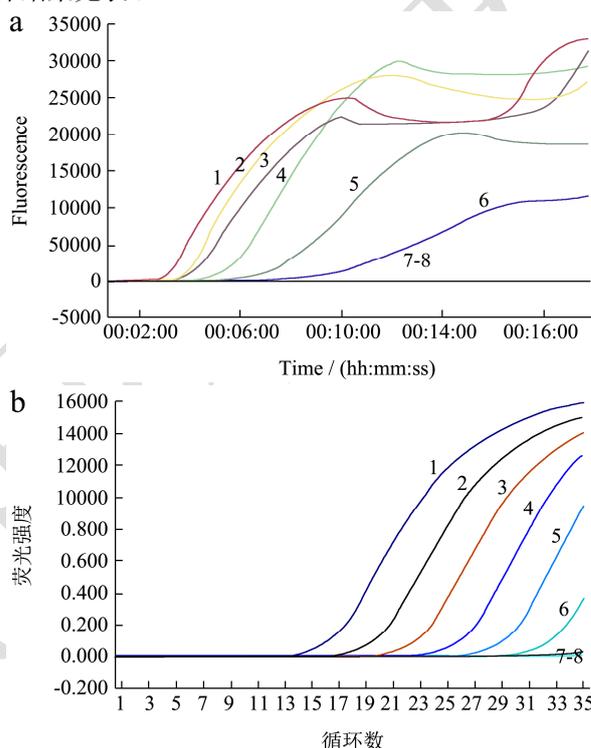


图 2 *LM* real-time RPA 和 real-time PCR 灵敏性结果

Fig.2 Sensitivity of real-time RPA and real-time PCR for LM

注: a.real-time RPA; b.real-time PCR; 1~8: $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^{-3}$ pg。

表 3 *LM*real-time RPA 与 real-time PCR 方法灵敏性结果比较

Table 3 Comparison of sensitivity results of real-time RPA and realtime-PCR for LM

DNA 浓度/pg	real-time RPA (TT 值, min:ss)	real-time PCR (Ct 值)
5×10^4	2:30	15.32
5×10^3	3:09	18.74
5×10^2	3:21	21.88
5×10^1	4:07	25.06
5×10^0	5:28	28.24
5×10^{-1}	7:12	31.70
5×10^{-2}	>20	>35
5×10^{-3}	>20	>35

2.3 LM real-time RPA 方法的重复性结果

重复性实验结果表明, 无论批内和批间重复实验

表4 LM real-time RPA 重复性实验

Table 4 Repeatability test of LM real-time RPA

浓度/pg	n	批内变异			批间变异		
		TT 值 (min:ss)		CV/%	TT 值 (min:ss)		CV/%
		mean	S.D.		mean	S.D.	
5×10 ³	5	3:11	0.05	1.61	3:06	0.03	0.98
5×10 ¹	5	4:15	0.10	2.41	4:10	0.08	1.95
5×10 ⁻¹	5	7:52	0.25	3.32	7:29	0.21	2.88

2.4 人工污染样品检测结果

通过计算原始菌液量, 最终添加至羊肉和生菜样品中的初始菌量分别为 3、29、62 CFU/25 g。取 14、20 h 的增菌液进行 LM 基因组 DNA 提取, 应用本研究建立的 real-time RPA 方法进行检测。结果表明, 空白对照无任何扩增曲线, 未检测到 LM, 说明实验成

Ct 值的标准差均小于 1, 变异系数<5% (见表 4), 说明所建立的方法具有良好的重复性。

立。对于接菌量为 3 CFU/25 g 羊肉和生菜样品, 增菌 14 h 后, real-time RPA 方法可在 12 min 内实现对 LM 的检测。对于相同样品, real-time PCR 与传统培养方法均检测到 LM。三种方法检测结果均一致, 但是 real-time RPA 能够在 12 min 内获得所有阳性结果, real-time PCR 需要 55 min, 而传统培养方法则需要 7 d (结果见表 5)。

表5 人工污染样品检测结果

Table 5 Results of artificially contaminated samples

样品	接菌量(CFU/25 g)	增菌时间/h	real-time RPA (TT, min: ss)	real-time PCR(Ct)	传统培养法 (7 d)	活菌量 (CFU/mL)	样品背景值
羊肉	3	14	11:27	32.80	+	8.1×10 ²	菌落总数
		20	10:15	28.88	+	9.5×10 ²	1.5×10 ³
	29	14	10:29	29.37	+	9.0×10 ²	CFU/g
		20	9:15	27.04	+	3.0×10 ³	大肠菌群
	62	14	7:49	26.01	+	4.5×10 ³	3.1×10 ²
		20	7:42	25.74	+	6.3×10 ³	CFU/g
生菜	3	14	11:34	32.92	+	4.8×10 ²	菌落总数
		20	9:32	28.07	+	2.8×10 ³	<10 CFU/g
	29	14	9:56	28.32	+	2.0×10 ³	<10 CFU/g
		20	9:10	26.56	+	3.8×10 ³	大肠菌群
	62	14	8:22	26.22	+	3.9×10 ³	<10 CFU/g
		20	6:30	23.20	+	7.4×10 ³	

注: +, 阳性结果。

3 结论

3.1 同其它核酸扩增技术相比, RPA 技术具有以下突出的优势: 操作简便、反应时间短、特异性强、灵敏性高、假阳性率低、对核酸要求质量不高等。但由于 RPA 反应原理和反应过程的特殊性, 所用引物探针的长度和标记方法与以往分子生物学方法标记不同, 在设计程序上要严格按照其规则进行, 尤其注意发卡结构和非特异性扩增的发生, 这也是决定其扩增成败的关键。只有完全掌握了 RPA 引物和探针的设计原则,

才能综合试验结果筛选出最佳的引物和探针。

3.2 本研究选取 LM 特异性基因 hlyA 为靶基因, 设计 RPA 引物和 exo 探针, 建立了 LM real-time RPA 方法。该方法仅对 LM 出现特异性荧光扩增曲线, 具有很好的特异性; 检出限可以达到 5×10⁻¹ pg LM 基因组 DNA, 与本实验室建立的 LM real-time PCR 方法一致, 但是 real-time RPA 所需要的反应时间远远少于 real-time PCR 方法。顾思宇等^[20]建立的 LAMP 方法对 LM 纯培养物的检测限为 2.27 fg/μL, 低于本研究建立的 real-time RPA 方法, 但 LAMP 反应时间为 45 min,

明显高于本研究建立的 RPA 方法。同时 real-time RPA 方法重复性良好, 无论批内还是批间其变异系数均小于 5%。

3.3 本研究中所选用生菜样品菌落总数和大肠菌群背景值低, 而羊肉样品背景值较高, 但是两种样品在人工污染相同浓度的 LM 时, 均可以通过 real-time RPA 实现有效检测, 说明所建立的 real-time RPA 方法受样品基质和背景值影响较小。样品增菌 14 h 后, 在接菌量为 3 CFU/25 g 时, real-time RPA 方法能够在 12 min 内实现对 LM 的检测; 在接菌量为 62 CFU/25 g 时, real-time RPA 仅需要 6~7 min 即可实现对 LM 的有效检测。对不同浓度和不同增菌时间的人工污染样品, real-time RPA 检测结果同 realtime-PCR、GB 4789.30-2016 一致, 但是检测时间大大缩短, 有效节约了人力物力成本, 能够实现 LM 的快速检测。

3.4 本研究建立的 LM real-time RPA 检测方法, 能够在 37 °C, 20 min 内实现对食品中 LM 的快速分子检测, 真正实现了快速、简便、灵敏和特异等特点, 并且不需要复杂的仪器设备, 可应用于食品突发事件中 LM 的现场快速检测, 对保障我国食品安全具有重要意义。在后续工作中, 本研究将继续完善大量临床样本的 LM real-time RPA 检测和方法验证, 以期形成相应的国家标准。同时探索食源性致病菌的多重 real-time RPA 方法和基于测流层析试纸条检测的 RPA 方法将是下一步的研究重点。

参考文献

- [1] 吴蜀豫,李迎惠,冉陆,等.中国 2001 年 11 省(市)食品中李斯特菌污染状况的主动监测[J].中华流行病学杂志,2003,24(8):657-660
WU Shu-yu, LI Ying-hui, RAN Lu, et al. Active surveillance on *Listeria monocytogenes* in seven kinds of food in 11 provinces of China in 2001 [J]. Chin J Epidemiol, 2003, 24(8): 657-660
- [2] Liu D Y, Ainsworth A J, Austin F W, et al. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91: 297-304
- [3] 朱静鸿,龚云伟,武艳力.食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况调查[J].中国卫生工程学,2016,5:491-493
ZHU Jing-hong, GONG Yun-wei, WU Yan-li. Contamination status of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Chin J Health Eng Oct, 2016, 5: 491-493
- [4] 赵薇,刘桂华,王艳秋,等.食品中单核细胞增生李斯特菌污染及耐药状况调查[J].中国卫生检验杂志,2012,6:1394-1395
ZHAO Wei, LIU Gui-hua, WANG Yan-qiu, et al. Contamination status and drug resistance of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 6: 1394-1395
- [5] Thønnings S, Knudsen J D, Schönheyder H C, et al. Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia [J]. Clinical Microbiology & Infection the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2016, 22(8): 725-730
- [6] Rietberg K, Lloyd J, Melius B, et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to a pasteurized ice cream product served to hospitalized patients [J]. Epidemiology & Infection, 2016, 144(13): 2728-2731
- [7] Melo J, Andrew P W, Faleiro M L. *Listeria monocytogenes*, in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses [J]. Food Research International, 2015, 67: 75-90
- [8] Scallan E, Hoekstra Rm, Angulo Fj, et al. Foodborne illnessacquired in the United States-major pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15
- [9] CDC. Recipe for Food Safety [EB/OL]. [2013-10-29]. <http://www.cdc.gov/vitalsigns/listeria/index.html>
- [10] GB 4789.30-2016,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[S]
GB 4789.30-2016, National food safety standard Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes* [S]
- [11] 唐廷廷,韩国全,王利娜,等.分子生物学技术在食源性致病菌检测中的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,9: 3497-3502
TANG Ting-ting, HAN Guo-quan, WANG Li-na, et al. Research progress of molecular biology techniques on detecting foodborne pathogens [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 9: 3497-3502
- [12] 刘万静,刘斌,李湘平,等.实时定量荧光 PCR 快速鉴定食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J].食品安全质量检测学报, 2017,8(1):252-255
LIU Wan-jing, LIU Bin, LI Xiang-ping, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by real-time PCR [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8(1): 252-255
- [13] 黄朱梁,薛超波,孙瑛,等.食品中单核细胞增生李斯特氏菌实时浊度(LAMP)检测方法的建立[J].食品工业,2015,1: 277-280

- HUANG Zhu-liang, XUE Chao-bo, SUN Ying, et al. Development of a real-time turbidimeter-based loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Industry, 2015, 1: 277-280
- [14] 徐潮,李亮,金芑军,等. 荧光 RPA 技术检测转基因水稻科丰 6 号[J]. 分子植物育种, 2014, 12(5): 875-880
- XU Chao, LI Liang, JIN Wu-jun, et al. Event-specific Real-time RPA Detection of Transgenic Rice Kefeng6 [J]. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(5): 875-880
- [15] Wang J, Liu L, Li R, et al. Rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 by recombinase polymerase amplification [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 2016, 28(5): 574
- [16] Wang J, Wang J, Li R, et al. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification [J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 241
- [17] Boyle D S, Mcnemeey R, Low H T, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification [J]. Plos One, 2014, 9(8): e103091
- [18] Euler M, Wang Y, Otto P, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(7): 2234-2238
- [19] Wu Y D, Zhou D H, Zhang L X, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for equipment-free detection of cryptosporidium, spp. oocysts in dairy cattle feces [J]. Parasitology Research, 2016, 115(9): 3551
- [20] 顾思宇,张红星,金君华,等. LAMP 法检测单核细胞增生性李斯特菌的研究[J]. 食品科技, 2016, 8: 297-301
- GU Si-yu, ZHANG Hong-xing, JIN Jun-hua, et al. Detection of *Listeramonoy ctogenes* by LAMP [J]. Food Science and Technology, 2016, 8: 297-301