· 检验技术 ·

食品微生物检测试剂盒评价方法建立与应用*

付溥博,张西萌,韩笑,刘莉,马丹,魏海燕,王紫薇,曹嘉悦,朱涵俊,曾静

摘　要:目的　建立实用可行的食品微生物检测试剂盒的评价方法。**方法**　本研究以 ISO 16 140 为理论基础、GB 4789. 10-2010 为参比方法,从检测特异性、灵敏度、耐变性/统计学分析等方面对 3M 公司 Petrifilm 大肠埃希氏菌检测试剂盒(PEC)进行了可替代性评价。**结果**　PEC 法对目标菌检测的特异性为 84%,对非目标菌检测的特异性为 100 %;灵敏度检测中在 25 份低浓度添加样品里,PEC 法的灵敏度有 22 份可以达到 10 CFU/g,3 份火腿样品的结果为阴性,国标法所有样品灵敏度均可达到 10 CFU/g;耐变性评价中,PEC 法在 35 ℃/37 ℃、18 h/24 h 耐变性条件的比较中检测结果差异均无统计学意义($P>0.05$);应用 2 种方法对添加高、中、低 3 个水平的大肠埃希菌的五大类样品进行测试,线性方程为 $y=0.942\ 1x+0.328\ 4$,相关系数为 0. 798 9,5 类样品不同方法测试结果差异均无统计学意义($P>0.05$);应用 2 种方法对 30 份自然样品进行检测,PEC 法检测出 4 份阳性样品,国标法检测出 6 份阳性样品,2 种方法阳性符合率为 93. 33%,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　以 ISO 16140 为理论基础可建立一套评价方法,此方法可系统的对微生物检测用试剂盒的可替代性进行评价。

关键词:食品;微生物;检测用试剂盒;评价方法

中图分类号:R155.5　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)06-0837-05　DOI:10.11847/zgggws2015-31-06-43

1102122 Establishment and application of bacteria in food

FU Pu-bo, ZHANG Xi-meng, HAN Xiao, et al (*Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Beijing* 100026, China)

Abstract: Objective　To establish a method for the detection fo bacteria in food with test kit. **Methods**　The study was based on ISO 16140. The GB4789. 10 – 2010 was used as the reference method. The petrifilm *E. Coli/Coliform* Count Plate(PEC) kit made by Minnesota Mining and Manufacturing Company was used in evaluations of specificity, sensitivity and stability of the kit. **Results**　Fifty stains of target bacteria and 25 stains of discordant species bacteria were detected with PEC and the specificity was 84% or the detection of target bacteria and that for non-target bacteria was 100%, with the sensitivities of 10 colony-forming uint(CFU)/g for low concentration isolates. Under different incubation conditions, the detection results of *E. Coli* at high, medium, and low concentration in 5 categories artificial samples of food showed no significant differences($P>0.01$ or $P>0.05$). **Conclusion**　With a series of ISO 16140 based evaluation method, the substitutability of test kit for detection of microorganisms in food could be evaluated.

Key words: food; microorganisms; test kit; evaluation method

随着现代检测要求的不断提高,人们逐渐发现传统的食品中微生物的检测方法往往存在检测周期长、工作量大、所需试剂多以及灵敏性低或特异性较差等缺点[1-2],而试剂盒方法则由于其使用方便、操作简单、出具结果更加快速等优点[2-3],越来越为检验工作人员所接受。但实验室在拟用这些试剂盒之前,应对其进行严格评价或确认[4]。目前,国际上常用的评价方法主要由国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)、美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)、食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)等机构制定,由于 ISO 方法的规定较为全面细致,故选用《ISO 16140 : 2003》[5]对拟用的试剂盒进行评价和确认。本研究以 ISO 方法为理论基础,以 3M 公司的 Petrifilm 大肠埃希氏菌检测试剂盒(Petrifilm E. Coli Count Plates, PEC)与经典国标方法相比较作为实例,对食品中微生物检测用试剂盒的评价方法及其应用进行研究,旨在建立实用可行的食品微生物检测试剂盒的评价方法。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株　大肠埃希菌标准菌株和分离株共计 50 株,其中标准菌株 6 株,2 株来自于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)(北京陆桥技术有限责任公司代理),4 株来自中国医学微生物菌种保藏管理中心(China Medi-

* **基金项目**:国家质量监督检验检疫总局科研项目(2013IK197)
作者单位:北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心,100026
作者简介:付溥博(1977 –),女,北京人,工程师,硕士,研究方向:食品微生物检测。
通讯作者:曾静,E-mail:zengj@ bjciq. gov. cn
数字出版日期:2015 – 3 – 24 15:05
数字出版网址:http://www. cnki. net/kcms/detail/21. 1234. R. 20150324. 1505. 002. html

cal Culture Collection Center, CMCC); 分离株 44 株,均为北京出入境检验检疫局技术中心自行分离。非目标菌株 20 株,包括蜡样芽孢杆菌 1 株、溶血性链球菌 2 株、金黄色葡萄球菌 1 株、粪肠球菌 1 株、铜绿假单胞菌 1 株、沙门氏菌 2 株、副溶血性弧菌 1 株、李斯特氏菌 7 株、志贺氏菌 2 株、小肠结肠炎耶尔森氏菌 1 株、非 O1 非 O139 群霍乱弧菌 1 株,其中 11 株来自于 ATCC,7 株来自于 CMCC,1 株来自于中国普通微生物保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),北京出入境检验检疫局技术中心自行分离 1 株。

1.1.2　样品　本研究选取具有代表性的五大类共 15 种食品,分别进行添加实验和实际样品实验,所有样品均购自北京市市区的 2 家超级市场。其中添加实验样品为火腿(肉制品)、多春鱼(海产品)、奶粉(乳制品)、麦片(杂品)和鸡肉(家禽),每种各取 5 份,别做高、中、低 3 个水平的添加;实际样品为猪肉馅和牛肉馅(肉制品)、多春鱼和墨斗鱼(海产品)、酸奶和奶酪片(乳制品)、花椒和小米面(杂品)和鸡心和烤鸭(家禽),每种各取 3 份。

1.1.3　培养基和试剂　磷酸盐缓冲液(由磷酸二氢钾配制,调解 pH 值到 7.2,北京化工厂);营养肉汤(NB)、结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)、结晶紫中性红胆盐 - 4 - 甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷琼脂(VRBA-MUG),均购自北京陆桥技术有限责任公司;PEC 测试片(美国 3M 公司)。

1.2　仪器与设备　MLS-3750 压力蒸汽灭菌锅(日本三洋电机有限公司);CLASSII A2 型生物安全柜(美国 LABCONCO 公司);HPP 260 恒温培养箱[(36 ± 5)℃,德国美墨尔特贸易有限公司];THZ-C-1 全温震荡器(江苏太仓市实验设备厂);STOMACHER 400 拍击式均质器(英国 SEWARD 公司);MS3 digital 漩涡混合器(德国 IKA 公司);TE612 - 2 天平(精确度 0.01 g,德国赛多利斯集团);MDF-U32V 超低温冰箱(-70℃,日本三洋电机有限公司)。

1.3　方法

1.3.1　传统测试法　按照国家标准《GB 4789.38 - 2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数》[6]第二法进行检测,无菌操作取25 g 样品于无菌过滤袋中,加入 225 mL 磷酸盐缓冲液,拍击均质,制成 1:10 的样品匀液,然后依次制成 10 倍递增稀释的样品匀液,选取 2 ~ 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液,每个稀释度接种 2 个无菌平皿,每皿 1 mL。同时取 1 mL 稀释液加入无菌平皿做空白对照。10 ~ 15 mL 冷至(45 ± 0.5)℃的 VRBA 倾注于每个平皿中。小心旋转平皿,将培养基与样品匀液充分混匀。待琼脂凝固后,再加 3 ~ 4 mL VRBA-MUG 覆盖平板表层。凝固后翻转平板,36 ℃培养 24 h。

1.3.2　PEC 法　无菌操作取 25 g 样品于无菌过滤袋中,加入 225 mL 磷酸盐缓冲液,拍击均质,制成 1:10 的样品匀液,然后依次制成 10 倍递增稀释的样品匀液,选取 2 ~ 3 个适宜的连续稀释度的样品匀液,每个稀释度接种 2 个测试片,吸取合适梯度的食品样品稀释液 1 mL,垂直滴加在掀开上层膜的测试片的中央处,小心地盖好上膜,防止产生气泡,将测试片的透明面向上,36 ℃培养 48 h。

1.3.3　特异性实验　选取 20 株经 viteke 确认的远源菌接种 PEC 测试片,观察菌落形态从而确定测试片针对非目标菌的特异性;选取确认为大肠埃希菌标准菌株及经 viteke 确证的分离株共 50 株接种 PEC 测试片,观察菌落形态,从而确定测试片针对目标菌的特异性。

1.3.4　添加实验　从大肠埃希菌(ATCC 25922)标准菌株的斜面上,挑取 1 环菌落接种于 50 mL 营养肉汤中,于 36 ℃摇动培养过夜(14 ~ 18 h),得到细菌培养原液。将培养原液用磷酸盐缓冲液分别稀释到低水平(10 ~ 100 CFU/mL)、中水平(100 ~ 1 000 CFU/mL)、高水平(1 000 ~ 10 000 CFU/mL)3 个水平。将制好的 3 个水平的菌液添加到选取的五类样品(火腿、多春鱼、奶粉、麦片、鸡肉)中,每类样品重复试验 5 次。分别采用国标法与 PEC 法对此 75 组样品进行大肠埃希氏菌的测定,比较 2 种方法之间是否有差异,确定 2 种实验的灵敏度。

1.3.5　耐变性实验　选取高和低 2 个污染水平的大肠埃希氏菌(ATCC 25922)分别于 35 和 37 ℃、18 和 24 h 的不同条件下培养,以确定测试片的耐变性。

1.3.6　实际样品检测　选取多春鱼、鸡心、猪肉馅、花椒、墨斗鱼、烤鸭、牛肉馅、酸奶、奶酪片、小米面共 10 种 30 组自然样品,分别采用国标法和 PEC 测定,比较 2 种方法之间是否有差异。

1.4　统计分析　应用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析。应用国标法和测试片法分别对阳性添加样品和实际样品中进行检测,对 2 种方法均为阳性的结果进行分析。为了获得更加对称的分布,将计数结果转化成对数形式,采用转换为 Log10 的值比较测试片方法与国标法的一致性。

2　结　果

2.1　特异性　将 20 株非目标菌接种于测试片,实验结果均未见菌落生长,说明 PEC 法针对非目标菌特异性为 100% (20/20);选择经确认的大肠埃希菌

标准菌株和分离株共 50 株接种于测试片，观察菌落形态，6 株标准菌株和 36 株分离株在测试片上菌落呈现典型蓝色并伴随有明显气泡，有 8 株分离株呈现大肠埃希菌非典型性菌落形态，说明 PEC 法针对目标菌特异性为 84%（42/50），非典型生长的 8 株菌经 viteke 鉴定为大肠埃希菌。

2.2　灵敏度（表 1）　将 10 ~ 100 CFU/mL 的菌悬液添加至 5 种添加实验样品中，分别应用国标法和 PEC 法进行测试，结果显示，PEC 法和国标法对低浓度添加样品的灵敏度基本可达到 10 CFU/g，在以火腿为基质时，PEC 法有 3 项实验未检测到目标菌，而国标法则均有检出，说明国标法的灵敏度略高于 PEC 法。

表 1　PEC 法和国标法对低浓度添加样品的测试结果

样品基质	实验次数	PEC 法计数值（CFU/g）	国标法计数值（CFU/g）
火腿	1	10	10
	2	10	20
	3	0	30
	4	0	10
	5	0	10
多春鱼	1	40	10
	2	20	20
	3	20	20
	4	10	10
	5	10	10
奶粉	1	10	10
	2	10	20
	3	10	10
	4	10	10
	5	10	10
麦片	1	20	10
	2	10	10
	3	10	10
	4	10	20
	5	10	10
鸡肉	1	10	20
	2	10	10
	3	10	10
	4	10	10
	5	20	10

2.3　耐变性（表 2）　选取高和低 2 个污染水平的大肠埃希菌（ATCC 25922）分别于 35 和 37℃、18 和 24 h 的不同条件下培养，结果显示，所有样品在 35 和 37℃条件下与 18 和 24h 条件下检测结果分别进行 t 检验，差异均无统计学意义（$P > 0.05$），说明 Petrifilm 测试片的耐变性良好。

2.4　实际样品检测（表 3）　应用国标法和 PEC 法同时检测多春鱼、鸡心、猪肉馅、花椒、墨斗鱼、烤鸭、牛肉馅、酸奶、奶酪片、小米面共 10 种自然样品，每种样品取 3 份。结果显示，PEC 法检测出阳性样品 4 份（鸡心 3 份、花椒 1 份），国标法检测出阳性样品 6 份（鸡心 3 份、猪肉馅 1 份、花椒 1 份、牛肉馅 1 份），2 种方法符合率为 93.33%（28/30）；PEC 法检测值大于国标法的为 1 份，占 3.3%（1/30）；PEC 法检测值小于国标法的为 4 份，占 13.3 %（4/30）；2 种方法完全相同的为 25 份，占 83.3%（25/30）。

表 2　耐变性试验结果

37 ℃培养 18 h		37 ℃培养 24 h		35 ℃培养 18 h		35 ℃培养 24 h	
计数值（CFU/g）	Log 值	计数值（CFU/g）	Log 值	计数值（CFU/g）	Log 值	计数值（CFU/g）	Log 值
2 000	3.30	3 100	3.49	3 700	3.57	2 800	3.45
2 800	3.45	2 800	3.45	2 300	3.36	3 100	3.49
40	1.60	20	1.30	10	1.00	20	1.30
40	1.60	10	1.00	50	1.70	20	1.30

表 3　10 种实际样品国标法和 PEC 法测试结果

基质	单位	国标法			PEC 法		
		1	2	3	1	2	3
多春鱼	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00[b]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
鸡心	CFU/g	320[a]	500[a]	290[a]	320[a]	420[a]	180[a]
	Log10	2.51	2.70	2.46	2.51	2.62	2.26
猪肉馅	CFU/g	<10	<10	24[a]	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.38	1.00	1.00	1.00
花椒	CFU/g	<10	<10	170[a]	<10	<10	190[a]
	Log10	1.00	1.00	2.23	1.00	1.00	2.28
墨斗鱼	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
烤鸭	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
牛肉馅	CFU/g	22[a]	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.34	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
酸奶	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
奶酪片	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
小米面	CFU/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Log10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

注：a 检测结果为阳性；b 为了便于计算，当菌落结果 <10 时，默认其 Log 值为 1.00。

中国公共卫生 CPH

2.5 添加实验样品检测(表 4、5)　应用国标法和 PEC 法同时检测火腿、多春鱼、奶粉、麦片、鸡肉 5 种添加实验样品共 75 份,国标法检测出阳性样品 75 份,PEC 法检测出阳性样品 72 份(3 份阴性样品为火腿),2 种方法符合率为 96.0%(72/75);PEC 法检测值大于国标法的为 13 份,占 17.3%(13/75);PEC 法检测值小于国标法的为 47 份,占 62.7%(47/75);2 种方法完全相同的为 15 份,占 20.0%(15/75)。以 PEC 法结果的自然对数值为因变量,国标法检测结果的自然对数值为自变量进行相关分析。结果显示,2 种方法测试大肠埃希菌总的线性方程为 $y = 0.9421x + 0.328\ 4$,相关系数为 0.798 9,火腿、多春鱼、奶粉、麦片、鸡肉的相关系数分别为 0.912 3、0.932 9、0.740 0、0.804 2、0.954 3。对 2 种方法检测出来的阳性样品测试结果进行比较,5 类样品不同方法测试结果差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4　5 种添加实验样品国标法和 PEC 法测试结果

样品基质	实验次数	高水平				中水平				低水平			
		国标法		PEC 法		国标法		PEC 法		国标法		PEC 法	
		计数值(CFU/g)	log 值	计数值(CFU/g)	log 值	计数值(CFU/g)	log 值	计数值(CFU/g)	log 值	计数值(CFU/g)	log 值	计数值(CFU/g)	log 值
火腿	1	1 800	3.26	600	2.78	120	2.08	130	2.11	10	1.00	10	1.00
	2	1 200	3.08	400	2.60	220	2.34	110	2.04	20	1.30	10	1.00
	3	1 400	3.15	1 000	3.00	160	2.20	60	1.78	30	1.48	<10	1.00
	4	1 400	3.15	1 000	3.00	180	2.26	80	1.90	10	1.00	<10	1.00
	5	900	2.95	1 400	3.15	160	2.20	60	1.78	10	1.00	<10	1.00
多春鱼	1	1 200	3.08	1 300	3.11	120	2.08	60	1.78	10	1.00	40	1.60
	2	1 200	3.08	900	2.95	130	2.11	80	1.90	20	1.30	20	1.30
	3	1 100	3.04	700	2.85	100	2.00	70	1.85	20	1.30	20	1.30
	4	1 600	3.20	900	2.95	120	2.08	160	2.20	10	1.00	10	1.00
	5	700	2.85	400	2.60	150	2.18	90	1.95	10	1.00	10	1.00
奶粉	1	2 100	3.32	800	2.90	130	2.11	10	1.00	10	1.00	10	1.00
	2	2 100	3.32	600	2.78	130	2.11	10	1.00	20	1.30	10	1.00
	3	1 900	3.28	1 100	3.04	190	2.28	10	1.00	10	1.00	10	1.00
	4	1 600	3.20	1 000	3.00	170	2.23	10	1.00	10	1.00	10	1.00
	5	1 500	3.18	500	2.70	110	2.04	10	1.00	10	1.00	10	1.00
麦片	1	1 400	3.15	1 300	3.11	120	2.08	150	2.18	10	1.00	20	1.30
	2	1 100	3.04	800	2.90	110	2.04	40	1.60	10	1.00	10	1.00
	3	2 200	3.34	400	2.60	90	1.95	140	2.15	10	1.00	10	1.00
	4	1 500	3.18	100	2.00	60	1.78	90	1.95	20	1.30	10	1.00
	5	1 100	3.04	1 700	3.23	80	1.90	50	1.70	10	1.00	10	1.00
鸡肉	1	1 700	3.23	1 600	3.20	140	2.15	90	1.95	20	1.30	10	1.00
	2	1 600	3.20	2 000	3.30	190	2.28	80	1.90	10	1.00	10	1.00
	3	2 200	3.34	1 100	3.04	220	2.34	110	2.04	10	1.00	10	1.00
	4	1 600	3.20	1 800	3.26	200	2.30	100	2.00	10	1.00	10	1.00
	5	1 500	3.18	1 400	3.15	240	2.38	120	2.08	10	1.00	20	1.30

3　讨　论

在当代食品微生物检测工作中,工作人员常常需要应用商品化试剂盒,而当这些试剂盒未被批准成为相应标准的时候,均属于非标准方法。当使用这些非标准方法之前,中国实验室国家认可委员会规定,实验室必须提前进行方法的评价与确认,只有当评价与确认符合要求时,这些方法才能替代标准方法来进行检测并出具实验结果[4]。大肠埃希菌以前一直被认为是寄生在人和动物体内的正常菌群,但机体抵抗力下降或当大肠埃希菌侵入肠外组织或器官时,则会引起感染。其引起的肠外感染,主

中国公共卫生 CPH

要为化脓性感染;部分血清型的大肠埃希菌可引起肠道内感染[7-8]。由于大肠埃希菌广泛存在与人和动物的粪便中,一旦在食品中检测到此菌,则表明该食品曾直接或间接被粪便所污染。在日常的检测工作中,大肠埃希菌有着较高的检出率,有报道称,在辽宁省沈阳市零售肉类中,大肠埃希菌在鸡肉、鸭肉和兔肉中检出率为 100%,猪肉中检出率为 85%,牛肉中为 89%[9]。在黑龙江省哈尔滨市腹泻病致病菌监测分析,致泻大肠埃希菌为主要的病源菌[10],因而对于食品中大肠埃希氏菌的检测有着重要的意义。近年来,为了减少检测时间,提高检测灵敏度与精确度,许多新的方法正逐步应用于大肠埃希菌的检测中,如基于 TyrFe3O4 MNPs-CNTsGCE 生物传感器流动注射的安培分析法[11]、铂纳米颗粒修饰电极的电化学法[12]、Micro-Snap 技术[13] 和 LAMP 法[14]等。随着研究的深入,许多快速检测方法都已经商品化。PEC 就是一种较成熟的检测大肠埃希菌的试剂盒,它含有结晶紫中性红胆盐、冷水可溶性凝胶和葡萄糖苷酶指示剂的载片,大肠埃希菌(97%)在此载片上能产生 β-葡萄糖苷酶与指示剂反应,产生蓝色沉淀并产生气泡。因此,检测者可通过目测对大肠埃希菌菌落数进行定量的快速检测。本研究以 ISO 16140 为理论基础,以对 PEC 的评价为实例,从而对试剂盒评价过程进行研究。旨在建立一套实用可行的试剂盒评价方法,为食品中微生物检测用试剂盒评价方法的研究与应用积累经验。

在进行方法评价的选材方面,ISO 规定需从肉制品、禽肉、海产品、水果和蔬菜奶制品、巧克力和面包食品及其他食品中选取 5 种不同种类的食品,每类取 3 个类型进行分析[5]。本研究选取的材料为本实验室附近超市易于采购的食品,具体操作时材料可根据各实验室情况进行自主选择。在特异性检测结果中,本实验室针对目标菌得出 PEC 法的特异性为 84%,此结果低于 3M 公司在其判读手册中所给出的 97% 的结论,这可能与本研究只选取了 50 株菌株进行实验有关,在今后的工作中,应进一步收集菌株,扩大实验量以进行确认。在灵敏度检测结果中,国标法的灵敏度略高于 PEC 法。在具体实验操作过程中,本研究发现由于国标法规定要选择菌落数在 10 ~ 100 CFU 的平板,需要在暗室中 360 ~ 366 nm 波长紫外灯照射下计数平板上发浅蓝色荧光的菌落,使得人为因素对结果的影响较为明显;而且此方法操作起来非常费力,其蓝色荧光较难看清,尤其是生长较小的菌落,基本难以看见;且长时间注视紫外线,操作人员的眼睛也易于疲劳,不利于工作人员的防护。因此,PEC 法的选择性较国标法更强,操作更简单易行,可以作为检测大肠埃希氏菌的有效替代方法。

参考文献

[1] 代娟,李玉峰,杨潇. 肠道致病菌多重 PCR 快速检测体系研究[J]. 中国公共卫生,2007,23(2):219 - 220.

[2] 王文娟,周明东,姜彦君,等. 食源性致病菌快速检测试剂盒的研制[J]. 中国食品学报,2012,12(2):144 - 150.

[3] 贺晨,孙鸿燕,邵丽筠,等. 4 种病原菌多重 PCR 检测方法建立[J]. 中国公共卫生,2011,27(4):525 - 527.

[4] 李宏,雷质文. 食品微生物检测方法确认和证实手册[平装][M]. 北京:中国标准出版社,2013:10.

[5] International Organization for Standardization. ISO E. N. 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods[S]. Switzerland:ISO,2003.

[6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.38 - 2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2012.

[7] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:295 - 296.

[8] 周庭银. 临床微生物学诊断及图解[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:142 - 145.

[9] 孙艳,汤雪梅,丛柏林,等. 沈阳市零售肉类大肠埃希菌与沙门菌污染调查[J]. 中国公共卫生,2005,21(10):1233 - 1234.

[10] 孙宏,关菲,句立言. 哈尔滨市腹泻病致病菌监测分析[J]. 中国公共卫生,2007,23(8):933.

[11] 程欲晓,刘亚军,黄晶晶,等. 基于 TyrFe3O4 MNPs-CNTsGCE 生物传感器流动注射安培分析法快速检测大肠杆菌[C]//第十届全国化学传感器学术会议,重庆,2008.

[12] 程欲晓,刘亚军,黄晶晶,等. 铂纳米颗粒修饰电极对大肠杆菌的快速电化学检测[C]//第十届全国化学传感器学术会议,重庆,2008.

[13] Peng Frank. Micro-Snap-快速检测大肠菌群和大肠杆菌技术[C]//2012 第五届中国北京国际食品安全高峰论坛,北京,2012.

[14] 刘莎,谌志强,杨栋,等. 用于水中常见大肠杆菌的 LAMP 快速检测[C]//2011 年全国环境卫生学术年会,深圳,2011.

收稿日期: 2014-02-24　　(郭薇编辑　韩仰欢校对)