

实验技术与方法

食品中单核细胞增生李斯特菌微滴数字PCR定量检测方法建立

魏咏新¹,马丹¹,董益阳²,魏海燕¹,李丹¹,张西萌¹,郭云昌³,李薇薇³,裴晓燕⁴,宋悦谦¹(1. 中国海关科学技术研究中心,北京 100026;2. 北京化工大学生命科学与技术学院,北京 100029;
3. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021;4. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司,北京 100070)

摘要:目的 建立食品中单核细胞增生李斯特氏菌的微滴式数字聚合酶链式反应(ddPCR)快速定量检测方法。方法 筛选单核细胞增生李斯特氏菌的特异性引物和探针,通过对目标菌纯菌液及人工污染样品的检测,比较ddPCR方法和平板计数法的定值效果,对ddPCR结果进行特异性、灵敏性和重复性分析。结果 本研究建立的单核细胞增生李斯特氏菌ddPCR检测方法具有良好的特异性、灵敏性和重复性。单核细胞增生李斯特氏菌纯菌液中定量限(LOQ)和检出限(LOD)均为136 CFU/mL,在鱿鱼圈和香肠样品中定量限分别为240 CFU/g和155 CFU/g。ddPCR在各梯度水平上变异系数均小于25%,ddPCR和平板计数定值对数值相对偏差均小于30%。结论 本研究建立的ddPCR方法能够快速、准确、灵敏、特异地定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌。

关键词:单核细胞增生李斯特氏菌;微滴式数字聚合酶链式反应;定量限;检出限

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)05-0937-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.05.012

Establishment of droplet digital PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foodWEI Yongxin¹, MA Dan¹, DONG Yiyang², WEI Haiyan¹, LI Dan¹, ZHANG Ximeng¹, GUO Yunchang³
LI Weiwei³, PEI Xiaoyan⁴, SONG Yueqian¹(1. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China;
2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;
3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China;
4. Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd, Beijing 100070, China)

Abstract: Objective A droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method was developed for the rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Methods** Specific primers and probes for *Listeria monocytogenes* were screened. The constant value effect of ddPCR method and plate counting method was compared through the detection of pure bacterial solution and artificially contaminated samples. The specificity, sensitivity and repeatability of ddPCR method were analyzed. **Results** The ddPCR had the characteristics of excellent specificity, sensitivity and repeatability in *Listeria monocytogenes* detection. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) in pure bacterial solution were 136 CFU/mL. The LOQ in squid ring and sausage samples was 240 CFU/g and 155 CFU/g. The coefficient of variation of ddPCR was less than 25% at each gradient level, and the relative deviation of the logarithm of ddPCR and plate counting was less than 30%. **Conclusion** The established ddPCR method is rapid, accurate, sensitive and specific for the quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in food.

Key words: *Listeria monocytogenes*; droplet digital polymerase chain reaction; limit of quantification; limit of detection

根据近几年中国食源性疾病暴发监测的数据,微生物因素导致的疾病一直居于首位^[1]。单核细胞

增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是危害公共卫生和食品行业的一种重要人畜共患病致病菌^[2],主要以食物为传播媒介,是重要的食源性致病菌。2002年,LM已被世界卫生组织列为四大重要的食源性致病菌之一^[3],在冰箱保存时间过长的乳制品、肉制品中最为多见^[4]。在工业化国家,李斯特菌病的发病率为每百万人口36例^[5]。2013—2017年全国共在64家哨点医院发现211例单核细胞增生李斯特菌感染病例^[6]。

收稿日期:2022-02-22

基金项目:海关总署科研项目(2021HK215);国家质量监督检验检疫总局科研项目(2017IK176)

作者简介:魏咏新 女 工程师 研究方向为食品安全微生物检测

E-mail:657799307@qq.com

通信作者:宋悦谦 男 工程师 研究方向为预防医学

E-mail:13436500493@139.com

致病菌定量检测对于执行食品微生物限量标准、对食品中的致病微生物进行风险评估更具有实际意义^[7-8]。联合国粮食及农业组织和世界卫生组织于2004年发布的即食食品中LM的风险评估技术报告中提到,LM致病是由摄入感染剂量约为 10^3 CFU/g的食物引起的^[9]。我国新修订的食品安全国家标准,GB 4789.30—2016^[10]与GB 4789.30—2010相比,增加了定量检测方法,预包装食品致病菌限量标准GB 29921—2021规定,即食生制动物性水产制品中LM限量为1组5个样品均小于100 CFU/g(mL),与世界其他国家及有影响力的联盟(如日本、澳大利亚、新西兰、瑞士、欧盟等)对某些特定食品(如冷藏、即食肉制品等)中LM限量一致。现行有效的国家标准中LM定量检测方法操作步骤多、检测周期长,有必要研究一种快速高效的定量检测方法应对日益增长快速定量检测需求。

作为第3代核酸扩增技术,微滴式数字聚合酶链式反应(Droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)可实现对DNA分子的绝对定量^[11],不需要内参基因和标准曲线^[12],可直接给出靶序列的拷贝数;具有良好的灵敏性和重复性,易于标准化;作为终点检测,对抑制剂的耐受度更高,可降低由食品基质所导致的检测偏差。本研究拟采用ddPCR技术建立LM的快速定量检测方法,对食品中LM的特异性、灵敏性、稳定性提供数据支持,为开展食品安全检测、风险评估等工作提供思路和借鉴。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Stomacher 400 高效拍打式匀浆器(英国 Seward 公司);THZ-C-1 台式全温振荡器(苏州培英实验设备有限公司);Fr-1iocell 恒温培养箱(德国 MMM 公司);5424 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);GeneAmp 9700 PCR 仪(美国 ABI 公司);QX200 ddPCR 系统(美国伯乐公司)。

脑心浸液肉汤(Brain heart infusion, BHI)培养基、磷酸盐缓冲液(Phosphate-Buffered Dilution, PBD)购自北京陆桥技术股份有限公司;李斯特氏菌显色培养基购自法国 Chromagar 公司;葡萄球菌裂解酶购自武汉光谷百桥生物;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,货号:DP302。

1.2 菌株信息

12 株菌(表 1)中包括 3 株 LM 标准菌株(ATCC 13932、ATCC 15313、ATCC 19111)、1 株自分离株以及 8 株其他李斯特菌和食源性致病菌(ATCC 19119、ATCC 35967、ATCC 35897、ATCC 25401、ATCC 33090、

表 1 实验用菌株列表

Table 1 List of experimental strains

序号	菌株名称	菌株来源及编号	数量
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932	1
2	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	1
3	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	1
4	<i>Listeria monocytogenes</i>	STRC 分离株	1
5	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	1
6	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	1
7	<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	1
8	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 25401	1
9	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	1
10	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	ATCC 12325	1
11	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	1
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1
合计			12

注:ATCC:美国典型培养物保藏中心;STRC:中国海关科学技术研究中心

ATCC 12325、ATCC 25922、ATCC 25923)。

1.3 实验方法

1.3.1 引物探针设计、合成与筛选

本文用到 4 套 LM 的引物探针,均委托上海生物工程股份有限公司进行合成。其中选取文献[2]中引物和探针 1 套,SN/T 1870—2016^[13]标准中的引物探针 1 套,另外选取 Genbank 数据库中公布的特异性强且高度保守的单拷贝基因:内化素基因(*InlA*, GenBank No. EF445938.1)和溶血素基因(*hly*, Genbank No. LC259879.1)作为靶序列设计引物和探针 2 套。4 套引物探针序列见表 2。

活化表 1 中所有菌株进行过夜培养,取 1 mL 过夜培养纯菌液进行梯度稀释提取 DNA。将表 2 中引物/探针通过 ddPCR 对表 1 中菌株进行检测,验证引物探针的有效性和特异性。

表 2 ddPCR 引物/探针序列

Table 2 Primer/probe sequences of ddPCR

靶基因名称	引物/探针名称	序列(5'-3')
<i>hlyA</i> ^[2]	Lmo-F1	TGCAAGTCCTAAGACGCCA
	Lmo-R1	CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA
	Lmo-P1	CGATTTCATCCGCGTGTTCCTTTTCG
SN/T 1870—2016 ^[13]	Lmo-F2	CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT
	Lmo-R2	CGGACCGAAGCCAACTA
	Lmo-P2	ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG
<i>InlA</i>	Lmo-F3	TAACAGACACGGTCTCGCAAA
	Lmo-R3	TCCCTAATCTATCCGCTGAAG
	Lmo-P3	AGATCTAGACCAAGTTACG
<i>hly</i>	Lmo-F4	CATGGCACCACCAGCATCT
	Lmo-R4	ATCCGCGTGTTCCTTTTCGA
	Lmo-P4	CGCCTGCAAGTCTAAGACGCCA

1.3.2 纯菌液平板计数

选取 2~3 个适宜梯度对 PBD 稀释的 LM(ATCC 13932)过夜培养纯菌液进行显色平板涂布计数(0.3、0.3、0.4 mL),36 °C 倒置培养 48 h。计数同一稀释度 3 个平板所有典型菌落数合计在 15~150 CFU 之

间的平板。

1.3.3 纯菌液 ddPCR 检测

1.3.3.1 DNA 提取

纯菌液进行 PBD 梯度稀释,取各稀释度菌液 1 mL 用于细菌基因组 DNA 的提取。先离心收集菌体细胞 ($12\ 000 \times g, 5\ min$),加入葡萄球菌裂解酶处理后,再用试剂盒提取 DNA,将 DNA 溶解在 $50\ \mu\text{L}$ TE 缓冲液中。

1.3.3.2 ddPCR 反应体系

$10\ \mu\text{L}$ ddPCR master mix for Probes (no dUTP), 上、下游引物各 $1.5\ \mu\text{L}$ (终浓度 $750\ \text{nmol/L}$), 探针 $0.5\ \mu\text{L}$ (终浓度 $250\ \text{nmol/L}$), DNA 模板 $5\ \mu\text{L}$, 用双蒸水补足总体积 $20\ \mu\text{L}$ 。

1.3.3.3 ddPCR 扩增及结果读取

将分装好的 $20\ \mu\text{L}$ 的 ddPCR 反应预混液和 $70\ \mu\text{L}$ 微滴生成油分别加入到微滴生成卡的相应位置中,置于微滴生成仪中进行微滴生成。用排枪将微滴缓慢转移至 96 孔板中,记录位置,封膜后转移至 PCR 仪上进行扩增反应。

扩增反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $10\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $58\ ^\circ\text{C}$ 退火 $1\ \text{min}$, 45 个循环; $98\ ^\circ\text{C}$ $10\ \text{min}$ (固化微滴)。将扩增产物置于微滴分析仪中,利用 QuantaSoft 软件进行结果读取和分析。ddPCR 测定结果与对应菌悬液浓度 (1 拷贝基因组对应 1 个 CFU 菌落) 的换算公式如下:

$$C_1 = N \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \quad \text{式(1)}$$

式(1)中: C_1 为对应菌液浓度 (CFU/mL); N 为 $20\ \mu\text{L}$ ddPCR 反应体系中测得的核酸拷贝数 (copies/ $20\ \mu\text{L}$); V_1 为提取核酸的最终定容体积 (μL); V_2 为 ddPCR 反应体系中加入的核酸模板体积 (μL); V_3 为提取的菌液体积 (mL)。

1.3.4 人工污染样品的检测

选择经传统方法验证不含目标菌的食品样品作为添加基质。按照 1.3.2 进行平板计数。取 10^{-5} 的菌液 $1\ \text{mL}$ 、 10^{-5} 的菌液 $4\ \text{mL}$ 、 10^{-6} 的菌液 $1\ \text{mL}$ 和 10^{-6} 的菌液 $2\ \text{mL}$ 分别添加到盛有 $25\ \text{g}$ 食品样品的均质袋中,各添加浓度分别设 3 个平行样品,另取 1 份 $25\ \text{g}$ 样品不添加菌液作为阴性对照。上述样品中加入 $225\ \text{mL}$ PBD,用拍击式均质器拍击 $2\ \text{min}$,制成含有不同污染水平的人工污染样品。取各样品匀液 $4\ \text{mL}$ 按照试剂盒要求提取 DNA,最终将 DNA 溶解在 $50\ \mu\text{L}$ TE 缓冲液中,进行 ddPCR 检测,按照公式(2)计算样品中目标菌的含量 (CFU/g),比较两种方法的检测效果。

$$C_2 = N \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \times 10 \quad \text{式(2)}$$

式(2)中: C_2 为检样中目标菌含量 (CFU/g); V_3 为提取的样品匀液体积 (mL),其余同式(1)。

2 结果

2.1 引物探针特异性筛选

用 4 套引物探针同时对 LM 标准菌株 ATCC 13932 基因组 DNA 进行 ddPCR 检测,结果显示 Lmo-F1/R1/P1 的扩增荧光信号最强 (图 1),取 Lmo-F1/R1/P1

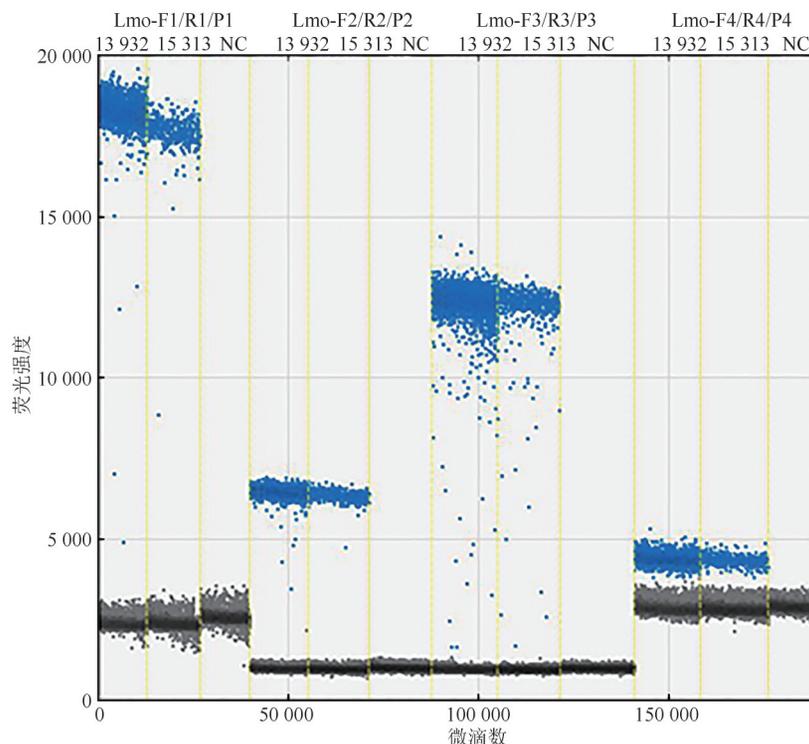


图1 4套引物探针 ddPCR 筛选

Figure 1 Screening of ddPCR with four primer probes

对3株LM标准菌株、1株自分离株以及8株其他李斯特菌和食源性致病菌进行检测,结果发现只有4株

LM扩增为阳性,其余检测均为阴性(图2),证明该套引物探针特异性良好。

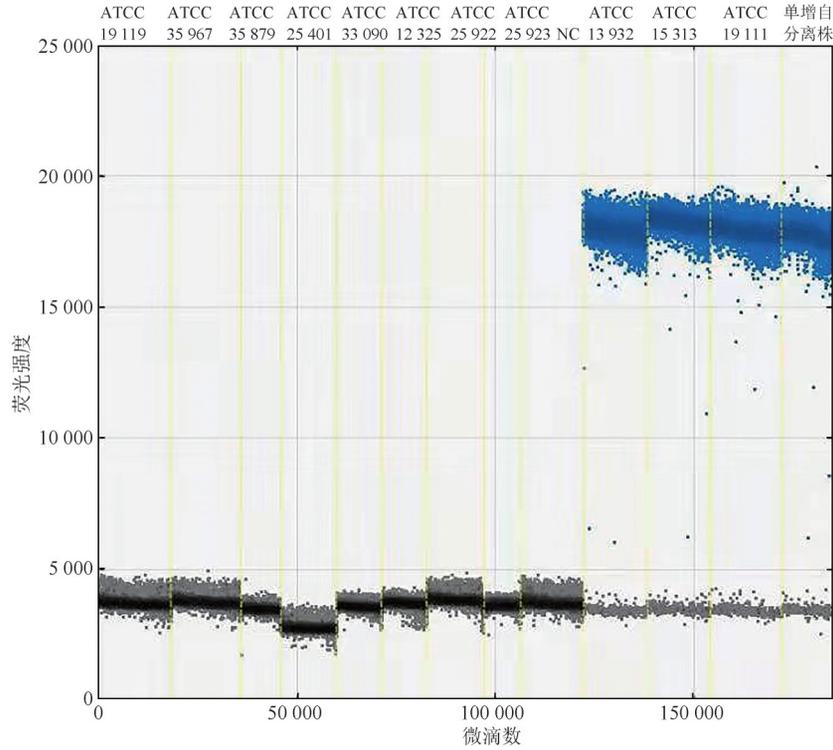


图2 ddPCR引物探针的特异性结果

Figure 2 Specific results of ddPCR primer probe

2.2 LM纯菌液的检测

2.2.2 ddPCR定值结果

2.2.1 平板计数定值结果

原始菌液平板计数结果是 4.62×10^9 CFU/mL, 对数值(lg)9.66 lg (CFU/mL)。

经ddPCR检测,LM(ATCC 13932)纯菌液在 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 稀释水平上,阳性微滴逐渐减少,最低可检测到 10^{-7} 稀释度(图3), 10^{-7} 稀释水平上5个平行样品均

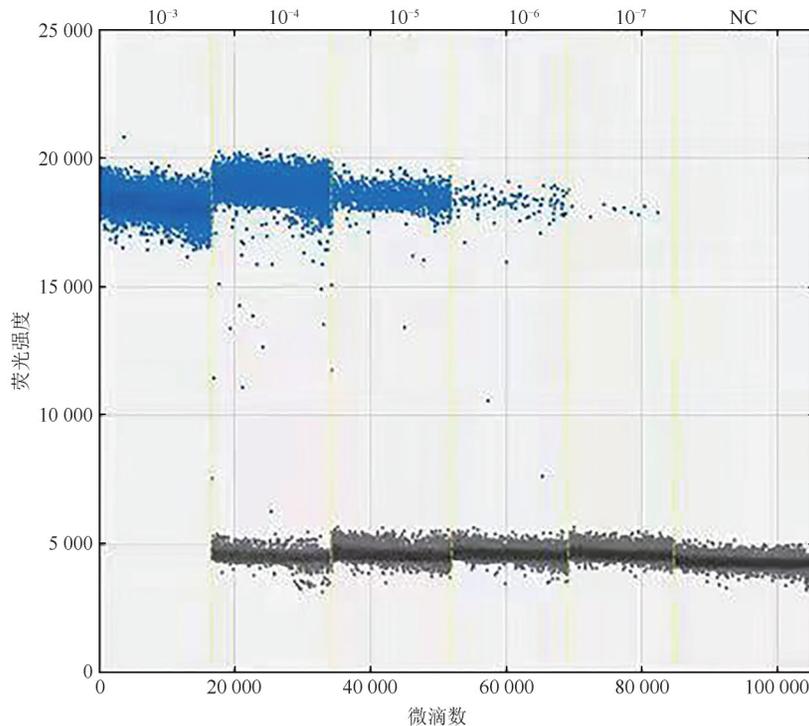


图3 梯度稀释的LM纯菌液ddPCR扩增微滴分布图

Figure 3 ddPCR microdroplet distribution of *Listeria monocytogenes* pure bacterial solution with gradient dilution

能检出,变异系数(Coefficient of variation, CV)为 10.40%,定量限(Limit of quantification, LOQ)和检出限(Limit of detection, LOD)均为 0.68 copies/ μ L,按公式(1)计算其对应原菌液浓度为 136 CFU/mL,灵敏性良好。在 10^{-4} ~ 10^{-7} 定值范围内,ddPCR 测得菌液浓度对数值为 2.13~5.30 lg(CFU/mL),与平板计数法测得值相比,其相对偏差满足微生物定量测量方法小于 30% 的要求^[14-15]。详见表 3。

表3 梯度稀释的 LM 纯菌液 ddPCR 定量检测结果

稀释因子	ddPCR 测定结果 (拷贝/ μ L)							ddPCR 测定菌液浓度/ lg(CFU/mL)	平板计数结果/ lg(CFU/mL)	ddPCR 和平板平均对 数值相对偏差/%
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平均值	CV/%			
10^{-4}	1 015	1 036	987	973	994	1 001	2.47	5.30	5.66	3.28
10^{-5}	81.6	84	81.1	73.3	84.5	80.9	5.56	4.21	4.66	5.07
10^{-6}	7	7.6	6.1	6.9	7.9	7.1	9.81	3.15	3.66	7.49
10^{-7}	0.66	0.76	0.71	0.57	0.69	0.68	10.40	2.13	2.66	11.06

表4 人工污染鱿鱼圈样品中 LM 的检测

Table 4 Detection of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated squid ring

添加菌液稀释度 /添加量	ddPCR 测定结果/(CFU/g)						ddPCR 和平板平均对数 值相对偏差/%
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	平均对数值	CV/%	
10^{-5} /4 mL	5 550	5 850	6 350	5 915	3.77	6.83	4.06
10^{-5} /1 mL	1 950	1 650	1 500	1 700	3.23	13.48	3.36
10^{-6} /4 mL	530	750	600	625	2.80	17.94	5.07
10^{-6} /2 mL	250	265	210	240	2.38	11.76	7.74

表5 人工污染香肠样品中 LM 的检测

Table 5 Detection of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated sausage

添加菌液稀释度 /添加量	ddPCR 测定结果/(CFU/g)						ddPCR 和平板平均对数值 相对标准偏差/%
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	平均对数值	CV/%	
10^{-5} /4 mL	3 200	3 300	2 850	3 117	3.49	7.58	8.13
10^{-5} /1 mL	750	635	650	678	2.83	9.22	10.70
10^{-6} /4 mL	420	395	340	385	2.59	10.63	9.94
10^{-6} /2 mL	135	160	170	155	2.19	11.63	13.18

2.4 重复性分析

LM 纯菌液稀释及人工污染样品 ddPCR 检测结果 CV 值均小于 25%,证明该方法用于 LM 定量检测时具有良好的重复性^[16]。

3 讨论

自商业化数字 PCR 平台推出以来,研究者们进行了大量的基于数字 PCR 技术的应用研究,近年国内外已有学者应用 ddPCR 技术检测单核细胞增生李斯特氏菌。NETZER 等^[9]利用数字 PCR 技术对水产养殖中重点细菌(包括单核细胞增生李斯特氏菌)进行绝对定量。赵丽青等^[2]利用 ddPCR 技术定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌,检出限为 3.6 ± 0.1 copies/20 μ L。GRUDLEWSKA-BUDA 等^[17]用经典培养法和数字 PCR 方法比较单核增生李斯特菌生物膜形成的强度,实验显示经典培养法和 ddPCR 法的结果相关性有统计学意义($P \leq 0.001$),表明 ddPCR 技术是检测生物膜中细菌数量的有效方

2.3 LM 人工污染样品的检测

分别在鱿鱼圈和香肠样品中添加不同浓度的 LM(ATCC 13932)制成人工污染的阳性样品,同时进行 ddPCR 检测和平板计数。结果发现鱿鱼圈和香肠样品中目标菌的 LOQ 分别达 240 CFU/g 和 155 CFU/g,灵敏性良好,所对应的 CV 值分别为 11.76% 和 11.63%,同平板计数结果相比,其对数值相对偏差均小于 30%。详见表 4、表 5。

可见 ddPCR 是一个比较成熟的检测技术,尝试将其应用在食品致病菌的定量检测中是一个正确的思路。

本研究通过 ddPCR 检测筛选出一套特异性良好的引物探针,对 LM 纯菌液及两种人工污染样品进行平板计数及 ddPCR 检测,比较两种定量方法的检测结果,分析 ddPCR 定量检测的 LOQ、LOD 及重复性,建立 LM 的 ddPCR 定量检测技术。LM 纯菌液中 LOQ 和 LOD 均为 136 CFU/mL,两种人工污染样品的检测中 LOQ 分别为 240 CFU/g 和 155 CFU/g, CV 值均小于 25%,ddPCR 与平板计数定值结果的对数值相对偏差均小于 30%。以上结果表明本研究建立的单核细胞增生李斯特氏菌 ddPCR 检测方法具有良好的特异性、灵敏性和重复性。相比现行国家标准可疑阳性样品 3~6 d 的检测周期,本研究建立的检测方法仅需 1~2 d,大幅缩短检测周期,为单核细胞增生李斯特氏菌高风险食品的快速检测提供一种新手段,为制订食品微生物定量检测标准提供技

术思路和数据支撑。

本研究制定的检测方法不能在检测前有效去除死菌体,可能会对实验结果产生影响,但本研究中均使用新鲜过夜培养菌液或人工污染样品进行检测,所以推测不会对本次实验结果有决定性影响。食品种类丰富多样,成分复杂,很可能有死菌体和多种杂菌,另外数字PCR检测平台QX200可以进行双通道检测,能实现更高效率、更经济的快速定量检测,所以有效除去样品菌液中的死菌,更多样化的高风险实际样品双重数字PCR检测是接下来值得关注的研究方向。

参考文献

- [1] 姬莉莉, 闫雪. 食品中微生物限量要求及检测技术发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 459-465.
JI L L, YAN X. Requirements of microbial limit and development trend of detection technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(2): 459-465.
- [2] 赵丽青, 方佩佩, 唐静, 等. 数字PCR定量检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4133-4138.
ZHAO L Q, FANG P P, TANG J, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by droplet digital PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(11): 4133-4138.
- [3] 马慧娟, 徐慧, 李俐俐, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌两种定量检测方法的比较[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 263-267.
MA H J, XU H, LI L L, et al. Comparison of two methods for detection of *Listeria monocytogenes* in foods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 263-267.
- [4] 林黎, 许毅, 何志凡, 等. 一起单核细胞增生李斯特菌引起婴儿感染的流行病学调查[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2021, 19(2): 99-101.
LIN L, XU Y, HE Z F, et al. Epidemiological investigation of an infant infection caused by *Listeria monocytogenes* [J]. Parasitoses and Infectious Diseases, 2021, 19(2): 99-101.
- [5] PAGLIANO P, ARSLAN F, ASCIONE T. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: Meningitis and bacteraemia [J]. Le Infezioni in Medicina, 2017, 25(3): 210-216.
- [6] LI W W, BAI L, MA X C, et al. Sentinel listeriosis surveillance in selected hospitals, China, 2013-2017 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2019, 25(12): 2274-2277.
- [7] 魏咏新, 张西萌, 魏海燕, 等. 克罗诺阪崎肠杆菌微滴数字PCR定量方法的建立[J]. 质量与安全检验检测, 2021, 31(S1): 62-70.
WEI Y X, ZHANG X M, WEI H Y, et al. Establishment of droplet digital PCR system for absolute quantitative detection of *Cronobacter sakazakii* [J]. Quality Safety Inspection and Testing, 2021, 31(S1): 62-70.
- [8] 陈爱亮. 食源性病原微生物快速检测技术应用现状与发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 173-186.
CHEN A L. Technology application status and development trend of rapid detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(1): 173-186.
- [9] NETZER R, RIBIĆIĆ D, AAS M, et al. Absolute quantification of priority bacteria in aquaculture using digital PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 183: 106171.
- [10] 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.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. Shipin anquan guoji biaozhun shipin weishengwuxue jianyan danhexibao zengsheng lisiteshijun jianyan: GB 4789.30—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [11] 魏咏新, 马丹, 李丹, 等. 食品中 *Escherichia coli* O157:H7 微滴数字PCR绝对定量检测方法的建立[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 259-265.
WEI Y X, MA D, LI D, et al. Establishment of droplet digital PCR system for absolute quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods [J]. Food Science, 2020, 41(16): 259-265.
- [12] 牛会敏, 王静怡, 姚晓洁, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应在食品安全检测领域的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9295-9300.
NIU H M, WANG J Y, YAO X J, et al. Application of droplet digital polymerase chain reaction in food safety detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9295-9300.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法: SN/T 1870—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Method for the detection of pathogens in food for export—Real-time PCR method: SN/T 1870—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [14] 隋志伟, 刘晓夏, 王晶, 等. 粘质沙雷氏菌测量方法研究[J]. 计量学报, 2018, 39(4): 588-592.
SUI Z W, LIU X X, WANG J, et al. Study on measurement method of *Serratia marcescens* [J]. Acta Metrologica Sinica, 2018, 39(4): 588-592.
- [15] Parenteral Drug Association. Evaluation, validation and implementation of new as microbiological testing methods: Technical Report No.33 [R]. Iowa City: PDA, 2000.
- [16] REN J N, DENG T T, HUANG W S, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173567.
- [17] GRUDLEWSKA-BUDA K, SKOWRON K, GOSPODAREK-KOMKOWSKA E. Comparison of the intensity of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* using classical culture-based method and digital droplet PCR [J]. AMB Express, 2020, 10(1): 75.