

## 实验技术与方法

## 双重 PCR 检测生鲜猪肉中大肠杆菌 O157:H7 和沙门菌方法的建立与应用

张秀方,武二丽,刘肖,张伟强,胡慧,邵刘云,王亚宾,陈丽颖  
(河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002)

**摘要:**目的 建立生鲜猪肉中大肠杆菌和沙门菌的双重 PCR 检测方法,并初步调查生鲜猪肉中大肠杆菌和沙门菌的污染情况。方法 以大肠杆菌 O157:H7 *rfbE* 基因和沙门菌 *invA* 基因为靶基因设计引物。通过对单个基因 PCR 和多重基因 PCR 扩增进行特异性、敏感性试验以及优化反应体系,建立快速检测大肠杆菌和沙门菌的双重 PCR 法。在郑州市不同地区的综合性超市、冷鲜肉专卖店和农贸市场随机抽检 144 份生鲜猪肉样品,分别进行了 PCR 检测和常规微生物学检验。结果 建立的双重 PCR 方法特异性好,抗干扰能力强,灵敏度可达到 10 pg/μl。在 144 份样品中检测出大肠杆菌的样品数为 10 份,检出率为 6.94%;检出沙门菌的样品数为 13 份,检出率为 9.03%;大肠杆菌和沙门菌同时检出的有 2 份,占总样品的 1.39%。结论 初步建立了同步、简便、快速、灵敏地检测生鲜猪肉中大肠杆菌、沙门菌的双重 PCR 方法;生鲜猪肉中存在致病菌的污染问题,将威胁到食品安全和人体健康,不容忽视。

**关键词:**大肠杆菌 O157:H7; 沙门菌; 生鲜猪肉; 双重 PCR; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155.5; R378.2<sup>+</sup>1; R378.2<sup>+</sup>2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)02-0150-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.012

Duplex PCR detection for *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in retailed raw porkZHANG Xiu-fang, WU Er-li, LIU Xiao, ZHANG Wei-qiang, HU Hui, SHAO Liu-yun,  
WANG Ya-bin, CHEN Li-ying(Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Henan  
Agricultural University, Henan Zhengzhou 450002, China)

**Abstract: Objective** To develop a multiplex PCR protocol by which *Escherichia coli* and *Salmonella* in raw pork could be simultaneously detected and investigate possible pathogenic bacteria contamination. **Methods** Primers were designed in accordance with the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157:H7 and *invA* gene of *Salmonella*. Through reaction optimization, specificity and sensitivity tests of single gene and multiplex gene PCR, a duplex PCR method was established for rapid detection of *Escherichia coli* and *Salmonella*. 144 raw pork samples were collected from different general supermarkets, chilled meat shops and farmer's markets in the city of Zhengzhou, and were analyzed by the PCR method. Conventional microbiological examination was also taken as a control. **Results** The duplex PCR protocol turned out to be specific, effective with a sensitivity of 10 pg/μl. The examination of the raw pork samples showed that 10 out of 144 were *Escherichia coli* positive (6.94%), whilst *Salmonella* was detected among 13 samples (9.03%), and 2 samples were both positive (1.38%). **Conclusion** A duplex PCR assay was established for the rapid simultaneous detection of *Escherichia coli* and *Salmonella*, and pathogenic bacteria contamination existed in raw pork which should be concerned about.

**Key words:** *Escherichia coli* O157:H7; *Salmonella*; raw pork; duplex PCR; foodborne pathogens; food safety

近年来,随着经济全球化进程加快,食品安全已成为当今世界性公共卫生热点。引起食源性疾

病的首要因素是食源性致病菌,其多数爆发案例是通过致病性细菌污染食品而引起的<sup>[1]</sup>。其中,大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门菌(*Salmonella*)是两种重要的致病菌,且以大肠杆菌对肉与肉制品的污染最为严重<sup>[2]</sup>。大肠杆菌 O157 具有强烈的致病性和致死性,感染后可并发肠出血症和溶血性尿毒症。沙门菌是一类对人类和动物具有极大危害的革兰阴性致病菌,常见的肉类食品和奶蛋类食品都会被

收稿日期:2014-10-31

基金项目:河南省重大科技攻关项目(112101110100)

作者简介:张秀方 女 硕士生 研究方向为食源性病原微生物的  
检验与分子生物学 E-mail:zxf1364386@163.com

通讯作者:陈丽颖 女 副教授 研究方向为食源性病原微生物的  
检验与分子生物学 E-mail:firebirdie@126.com

沙门菌污染,对人们的健康和生命安全将构成严重威胁<sup>[3]</sup>,在世界各地的食物中毒中,沙门菌引起的中毒病例占首位或第二位<sup>[4]</sup>。

猪肉作为我国消费量最大的肉类食品,也是大肠杆菌和沙门菌污染的高危畜产品,因此对其进行致病菌检测具有重要的食品卫生学意义。目前,对致病菌的检验大多仍沿用传统的细菌培养及鉴定方法,操作繁琐,耗时耗力,并且敏感性也较低<sup>[5]</sup>,不能满足突发事件中快速、灵敏、准确的检测要求。自二十世纪八十年代中期起,PCR 技术可用来快速、敏感、特异地检出不同食品样品中的病原菌。多重 PCR 技术能够在同一反应体系中同时检测不同目的菌,应用前景广泛<sup>[6]</sup>。因此,本研究以大肠杆菌 O157: H7 *rfbE* 基因和沙门菌 *invA* 基因为研究对象,建立了一种快速、灵敏且特异性强的双重 PCR 方法,实现了对猪肉中这两种致病菌的同时检测。应用此方法抽查了郑州市几家综合型超市、冷鲜肉专卖店及农贸市场销售的生鲜猪肉,初步了解了大肠杆菌和沙门菌在猪肉中的污染情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及样品来源

大肠杆菌 O157: H7 (ATCC 43895)、沙门菌 (14028F1)、产气荚膜杆菌 (*Bacillus perfringens*, 13124F0)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus Cereus*, 11778F0)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 19114F0)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)、溶血性链球菌 (*Streptococcus hemolyticus*, ATCC 21059) 等标准菌株均由河南农业大学动物微生物学与免疫学实验室保存。

144 份待检生鲜猪肉样品先后采集自郑州市区 5 家综合性超市、7 家冷鲜肉专卖店和 8 个农贸市场的生鲜猪肉销售点,每个抽样点抽取样品数不少于 5 份。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 仪 (S1000™ Thermal Cycler, 美国 Bio-Rad)、凝胶图像分析系统 (AlphaLmager™2200, 美国 Alpha Innotech)、离心机、电泳槽、电泳仪、水浴恒温振荡器、sp-D 垂直净化工作台、ZF 型紫外透射反射分析仪、恒温培养箱、水浴锅、压力蒸汽灭菌器、磁力加热搅拌器、旋涡混合器。

PCR 反应试剂: DL2000 DNA Ladder Marker、Agarose-Molecular Biology Grade 琼脂糖均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, *Taq* PCR Mastermix 和 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒均购自上海

生工生物工程有限公司, DNA Green 核酸染料 (北京天恩泽生物技术有限公司), Luria-Bertani (LB)、1 × TAE 电泳缓冲液、无水乙醇、异丙醇。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 收录的大肠杆菌 O157: H7 *rfbE* 基因和沙门菌 *invA* 基因序列,应用软件 Premier 5.0 设计两对引物 (见表 1),并送上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 引物设计及相关信息

Table 1 Information about the primers

菌种名称	目的基因	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	<i>rfbE</i>	F: AAGGGTTGCTCTTCATTTAG	678
		R: GACCATCCAATAAGTGTG	
沙门菌 ( <i>Salmonella</i> )	<i>invA</i>	F: GCTCTTTCGTCTGGCATT	351
		R: AACCTCATCGCACCGTCA	

#### 1.2.2 样品处理与细菌基因组 DNA 的提取

将保存的菌种复苏后在 LB 营养琼脂平板上划线, 37 °C 培养 16 h。挑取典型单个菌落接种于 LB 液体培养基过夜培养,参照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明,分别进行各参考菌株基因组 DNA 的提取,并以相同方法制备待检肉样菌液混合 DNA 模板。

样品处理参照食品安全国家标准 GB 4789.10—2010《食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌》<sup>[7]</sup>处理,然后将处理的样品接种于 LB 液体培养基中,参照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明提取样品 DNA。

#### 1.2.3 单基因 PCR 扩增及分析其特异性和敏感性

首先扩增大肠杆菌 O157: H7、沙门菌、产气荚膜杆菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌及溶血性链球菌反应体系 (25 μl) 分别为: 2 μl 模板 DNA, 2.5 μl 10 × 扩增缓冲液 (包含 1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、50 mmol/L KCl、PH = 8.3 Tris-HCl), 4 种 0.5 μl 20 mmol/L dNTP、20 pmol/L 上下游引物各 1 μl, 2 μl 1 U/μl *Taq* DNA 聚合酶,其余用高压过的三蒸水补足至 25 μl。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, PCR 循环为 94 °C 变性 45 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖电泳分离检测, DNA Green 核酸染料染色判断结果, 将电泳结果正确的目的基因送至上海生工进行测序。

敏感性试验: 按 1.2.2 所述方法提取 DNA, 分别测定大肠杆菌和沙门菌的 DNA 模板浓度, 稀释成相同浓度 10<sup>5</sup> pg/ml 后 10 倍递增稀释 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>5</sup> pg/μl, PCR 扩增后进行检测, 此体系可检测到的最高稀释度即为最高灵敏度。

### 1.2.4 双重 PCR 反应条件优化

以大肠杆菌和沙门菌混合 DNA 为模板,对引物、退火温度、酶等因素进行摸索。为了使双重体系中两对引物均能得到高效扩增,通过预试验首先确定了对试验结果影响较小的因素 2.5 μl 10 × PCR buffer,在此基础上对反应体系其他因素进行优化,其中根据 PCR 反应退火温度一般应低于 Tm 值 3 ~ 5 °C 的原则,通过设置不同温度梯度研究退火温度对双重 PCR 反应的影响;退火温度:58、57.5、56.6、54.1、53.2、52.5、52.51 °C。在确定最佳退火温度下,加入不同量的 Mg<sup>2+</sup>、上下游引物、聚合酶、dNTP,以研究各因素对双重反应的影响,引物加入量:0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0 μl (20 pmol/L); Mg<sup>2+</sup> 终浓度:15、20、25、30、35 mmol/L; dNTP 终浓度:15、18、20、23、25、28、30 mmol/L;混合模板量:2、3、4、5、6、8 μl 于 1% 的琼脂糖凝胶中,根据条带的清晰程度亮度差别,确定最佳反应体系。

### 1.2.5 双重 PCR 体系的特异性和敏感性试验

采用已建立的双重 PCR 体系对大肠杆菌、沙门菌、产气荚膜杆菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌及溶血性链球菌的混合 DNA 和去离子水进行双重 PCR 扩增,以检测引物和反

应的特异性。

把大肠杆菌和沙门菌基因组 DNA 模板混合,使用最佳退火温度,按 1.2.4 的反应条件进行双重 PCR 扩增,测定双重 PCR 扩增的敏感性。

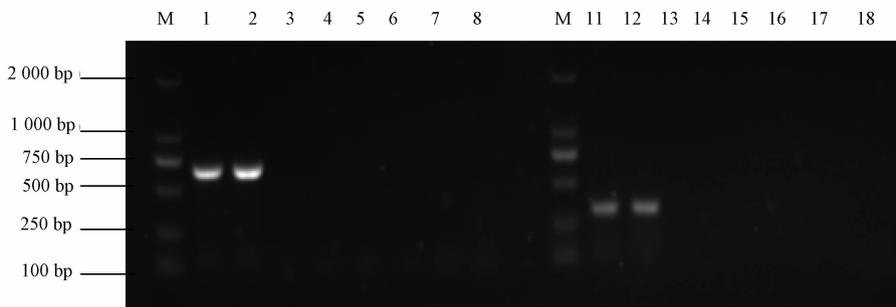
### 1.2.6 生鲜猪肉中致病菌的双重 PCR 检测与分析

从河南郑州多家综合型超市、冷鲜肉专卖店及农贸市场等不同地方采集新鲜猪肉样品,分别在营养肉汤中增菌培养,提取细菌基因组 DNA 并进行 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 单基因 PCR 特异性和敏感性分析

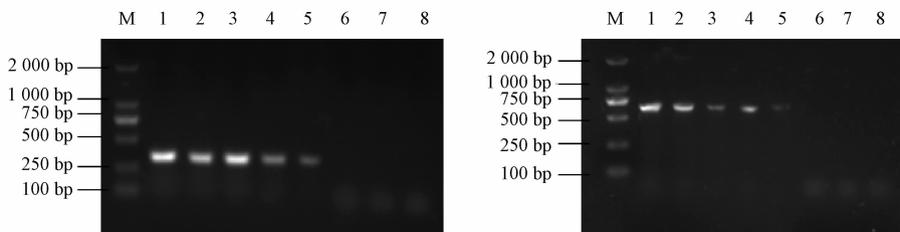
单重 PCR 检测结果显示,应用针对大肠杆菌 *rfbE* 基因的引物扩增出了大小约为 678 bp 的产物,而对沙门菌 *invA* 基因也扩增出大小约为 351 bp 的片段,而在产气荚膜杆菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌及溶血性链球菌均为阴性,见图 1。上述 PCR 产物经测序分析,与 GenBank 中公布的基因序列同源性均达到 99.9%,说明所扩增条带就是预期的目的基因片段。敏感性分析表明,对大肠杆菌灵敏度达到 10 pg/μl,对沙门菌灵敏度也为 10 pg/μl,见图 2。



注: M: 2 000 bp DNA Marker; 1~2: 大肠杆菌; 3和13: 产气荚膜杆菌; 4和14: 蜡样芽胞杆菌; 5和15: 单增李斯特菌; 6和16: 金黄色葡萄球菌; 7和17: 溶血性链球菌; 8和18: 阴性对照; 11~12: 沙门菌

图 1 大肠杆菌和沙门菌特异性 PCR 结果

Figure 1 PCR result of *Escherichia coli* and *Salmonella* specificity



注: M: 2 000 bp DNA Marker; 左图1~7: 沙门菌DNA不同稀释度10<sup>5</sup>~10<sup>-2</sup> pg/μl; 右图1~7: 大肠杆菌DNA不同稀释度10<sup>5</sup>~10<sup>-2</sup> pg/μl; 8: 阴性对照

图 2 大肠杆菌和沙门菌的敏感性 PCR 结果

Figure 2 PCR result of *Escherichia coli* and *Salmonella* sensitivity

### 2.2 双重 PCR 的扩增及条件优化

通过设置不同的温度梯度来研究温度对双重

PCR 反应的影响,温度梯度 PCR 试验显示,在 51 ~ 54 °C 之间均能扩出比较亮的条带,引物之间的相互

竞争和相互影响小,扩增效果都比较理想。在该试验中,双重 PCR 体系的退火温度就选为 53.2 °C,见图 3。

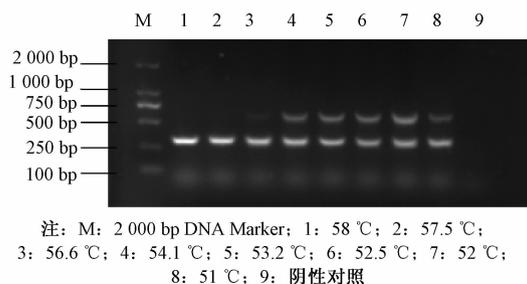


图 3 退火温度的优化

Figure 3 Optimization of the annealing temperature

以混合的大肠杆菌和沙门菌 DNA 为模板,在配合其他条件参数的调节得到优化的多重 PCR,经一系列试验条件筛选,最终确定双重 PCR 最佳反应体系为: 2.5 μl 10 × PCR buffer, 2 μl 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μl 25 mmol/L dNTP、4 μl 1 U/μl Taq DNA 聚合酶, 20 pmol/L 上下游引物 2 种菌各 1 μl; 4 μl 模板 DNA, 其余 ddH<sub>2</sub>O 补齐; 总体积 25 μl。其反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 53.2 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

在优化的 PCR 反应条件下,该双重 PCR 对大肠杆菌、沙门菌的检测灵敏性达到 10<sup>2</sup> pg/μl。应用该优化体系对 7 个受试菌株的混合 DNA 模板进行 PCR 扩增,仅在大肠杆菌和沙门菌相应基因位置上出现特异性目的条带,而其他 5 种细菌未出现非特异性扩增,说明了该方法高度的特异性,见图 4。

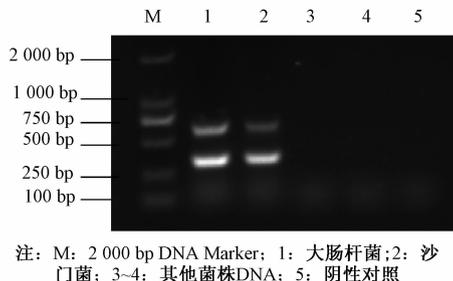


图 4 双重 PCR 特异性检测结果

Figure 4 Result of the specificity detecting by duplex PCR

### 2.3 应用双重 PCR 对 144 份肉样检测的结果

对生鲜猪肉的双重 PCR 检测结果分别见图 5 和表 2。结果显示,从 144 份生鲜猪肉样品中检测出大肠杆菌阳性 10 份,检出率为 6.94% (10/144); 检测出沙门菌阳性样品 13 份,检出率为 9.03% (13/144); 同时检出大肠杆菌和沙门菌的有 2 份,检出率为 1.39% (2/144)。

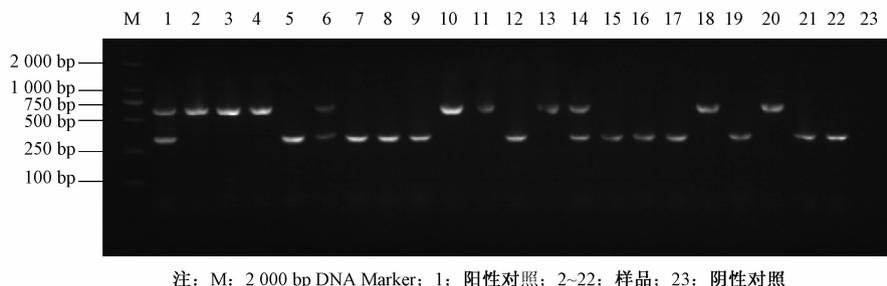


图 5 部分生鲜猪肉样品双重 PCR 检测结果

Figure 5 Results of detection by duplex PCR for part of raw pork samples

表 2 生鲜猪肉中大肠杆菌和沙门菌双重 PCR 检测结果

Table 2 Duplex PCR results of the *Escherichia coli* and *Salmonella* in raw pork samples

样品来源	大肠杆菌 阳性率/%	沙门菌 阳性率/%	双阳性率 /%
综合性超市	5.00(2/40)	7.50(3/40)	0.00(0/40)
鲜肉专卖店	4.00(2/50)	6.00(3/50)	0.00(0/50)
农贸市场	11.11(6/54)	12.96(7/54)	3.70(2/54)
合计	6.94(10/144)	9.03(13/144)	1.39(2/144)

### 3 讨论

近年来,单种致病菌的 PCR 快速检测方法被建立起来,例如大肠杆菌、沙门菌、志贺菌、李斯特菌等。但是在食品生产和流通过程中,质检部门需同时对大批食品中的多种致病菌同时进行检测,如果采用单一一致病菌快速显色培养基检测或单一菌的

PCR 检测,已经不能满足大量、快速检测的需要。多重 PCR 技术是在常规 PCR 的基础上改进并发展起来的一种新型 PCR 扩增技术<sup>[8]</sup>。其原理与常规 PCR 基本相同,只是在同一反应体系中加入多对特异性引物,如果存在与各对引物互补的 DNA 模板,则可在同一反应管中同时扩增出多条目的 DNA 片段。多重 PCR 技术具有高效、快速且低成本等优点,目前已在一些病原微生物的检测中得到了初步的应用<sup>[9-11]</sup>。

本试验选择大肠杆菌 O157:H7 抗原 *rfbE* 基因,因为有研究证实了 *rfbE* 基因是大肠杆菌 O157:H7 的特异基因<sup>[12-13]</sup>。因此,采用 *rfbE* 基因作为靶标可实现对大肠杆菌 O157:H7 的准确检测。而沙门菌的 *invA* 基因核苷酸序列在该属细菌中存在高度

的同源性,可作为属特异性鉴定依据。本试验选取这两种基因作为靶基因建立的双重 PCR 方法,实现了对猪肉中大肠杆菌和沙门菌的同时检测,其灵敏性可达  $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ,这远高于杨小娟等<sup>[14]</sup>所建立的类似方法(其双重 PCR 灵敏度为  $32 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ),由此可见,本试验所建立的双重 PCR 检测方法能同时检测两种致病菌,特异性好,灵敏度高,能满足对市场生鲜猪肉快速检测和监控的需要,可为食品中致病菌的快速检测提供依据。

多重 PCR 的扩增对反应条件要求严格,如果不严格控制则容易出现非特异性扩增从而导致最终扩增失败<sup>[15]</sup>。其中,退火温度是影响 PCR 特异性的重要因素,温度过高将影响模板和引物的结合而使扩增效率降低,过低则会导致非特异扩增<sup>[16]</sup>。本研究先分别进行了两种模板的单重 PCR 退火温度摸索,寻找出一致的退火温度,然后再进行双重 PCR 体系的退火温度优化,取得了最佳效果,且稳定性良好。

本检测结果提示,当前市售生鲜猪肉中存在着大肠杆菌 O157:H7 和沙门菌等致病菌的轻度污染,需引起重视。究其原因,可能与动物生前的健康状况与体表卫生清洁程度、屠宰加工操作规范及屠宰用水卫生状况以及鲜肉保藏、运输、销售等环节的交叉污染等因素有关。本研究中来自农贸市场和综合超市的样品阳性检出率相对较高,可能是由于这些地点人口流动大、冷藏保障不到位、售卖人员操作不当等造成的。然而,样品中存在极少量致病菌可能对食肉安全影响不明显,但由于 PCR 的灵敏性极高,在实际检测过程中就可能扩增出其 DNA。因此可先利用多重 PCR 方法对样品进行初筛,然后再结合国标法验证,从而提高检测的准确率<sup>[17-18]</sup>。

## 参考文献

- [ 1 ] 张敏,童华荣,张丽平,等. 动物性食品安全现状及其对策[J]. 食品工业科技,2005(5):182-186.
- [ 2 ] Gooding C M, Choudary P V. Rapid and sensitive immunomagnetic separation-polymerase chain reaction method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and ice-cream[J]. J Dairy Res,1997,64(1):87-93.
- [ 3 ] 黄金林,焦新安,文其乙,等. 直接 ELISA 和 PCR 相结合快速检测样品中的沙门氏菌[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(4):321-327.
- [ 4 ] 向雪菲,刘斌,张利达,等. 食品中沙门氏菌分子检测靶点的筛选与评价[J]. 微生物学报,2008,48(7):941-946.
- [ 5 ] Call D R, Borucki M K, Loge F J. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays[J]. J Microbiol Methods,2003,53(2):235-243.
- [ 6 ] 张玉霞,黄鸣. 食品检验中多重 PCR 技术的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(5):958-960.
- [ 7 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 10—2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [ 8 ] 郝玉芹,孙皆宜,李艾,等. 正交优化多重 PCR 反应体系检测 3 种食源性致病菌的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):602-605.
- [ 9 ] 凌霞,张敬平,肖勇,等. 食源性致病菌多重 PCR 快速检测方法建立与应用[J]. 微生物学杂志,2010,30(4):39-43.
- [ 10 ] 商颖,许文涛,元延芳. 通用引物多重 PCR 技术检测 3 种病原微生物[J]. 食品科学,2011,32(10):103-106.
- [ 11 ] Kawasaki S, Fratamico P, Horikoshi N, et al. Development of the multiplex PCR detection kit for *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7[J]. Japan Agricultural Research Quarterly,2011,45(1):77-81.
- [ 12 ] Bilge S S, Vary J C, Dowell S F, et al. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an rfb locus[J]. Infect Immun,1996,64(11):4795-4801.
- [ 13 ] WANG L, Reeves P R. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes[J]. Infect Immun,1998,66(8):3545-3551.
- [ 14 ] 杨小娟,吴清平,张菊梅,等. 畜禽肉沙门氏菌和大肠杆菌 O157 多重 PCR 检测研究[J]. 微生物学通报,2008,35(3):470-474.
- [ 15 ] Agersborg A, Dahl R, Martinez I. Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods[J]. Int J Food Microbiol,1997,35(3):275-280.
- [ 16 ] 黄银花,胡晓湘,占利,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传,2003,25(1):65-68.
- [ 17 ] Pal A, Labuza T P, Diez-Gonzalez F, et al. Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and *Psychrotroph* growth[J]. Int J Food Microbiol,2008,126(1):49-56.
- [ 18 ] 汪学荣,彭祥伟. PCR 技术检测肉中食源性病原菌的研究进展[J]. 肉类工业,2010(7):52-55.