

网络出版时间:2014-07-09 11:51

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.08.009

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.08.009.html>

3 种单增李斯特氏菌快速检测方法的比较

周 阳¹, 祝长青², 郭桂萍², 徐幸莲³, 徐宝才⁴, 薛建丽⁵,
蒋 原², 杨 军⁵, 郭云昌⁶, 刘秀梅⁶, 付瑞燕¹

(1 安徽农业大学 茶与食品科技学院, 安徽省食品安全分析与检测省级实验室, 安徽 合肥 230000;

2 江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001; 3 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095;

4 江苏雨润食品产业集团有限公司, 江苏 南京 210041; 5 南京市产品质量监督检验院, 江苏 南京 210028;

6 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022)

【摘 要】 【目的】确定适用于不同条件下快速检测单增李斯特氏菌的方法。【方法】以单增李斯特氏菌标准菌株 CMCC54004 和市售盐水鸭、凉拌菜为研究对象, 按照国家标准(GB 4789.30-2010)对检测样品进行选择培养, 选择阴性样品进行人工布菌, 比较单增李斯特氏菌蛋白条检测法、CPA 恒温扩增法以及实时荧光 PCR 方法的检测效果, 并以传统平板分离法进行验证。【结果】蛋白条检测法操作简单但灵敏度低, 最低检测限为 10^6 cfu/mL; 实时荧光 PCR 方法灵敏度高, 最低检测限为 10^1 cfu/mL, 但操作繁琐, 对操作技术及实验室条件要求较高; CPA 恒温扩增方法灵敏度相对较高, 最低检测限为 10^5 cfu/mL, 操作相对简单。【结论】实时荧光 PCR 方法适合灵敏度要求高、且具备良好实验条件时使用; CPA 恒温扩增法适于对灵敏度要求不高、实验室条件简单的基层实验室使用。

【关键词】 单增李斯特氏菌; 检测方法比较; 蛋白条检测法; CPA 恒温扩增法; 实时荧光 PCR 方法

【中图分类号】 TS207.4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)08-0119-06

Comparison of three analytical methods for rapid detection of *Listeria monocytogenes*

ZHOU Yang¹, ZHU Chang-qing², GUO Gui-ping², XU Xing-lian³, XU Bao-cai⁴,
XUE Jian-li⁵, JIANG Yuan², YANG Jun⁵, GUO Yun-chang⁶, LIU Xiu-mei⁶, FU Rui-yan¹

(1 Anhui Provincial Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food Safety, School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230000, China; 2 Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing, Jiangsu 210001, China; 3 Institute of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 4 Jiangsu Yurun Food Industry Group Co., LTD, Nanjing, Jiangsu 210041, China; 5 Nanjing Insititue of Supervision & Testing on Product Quality, Nanjing, Jiangsu 210028, China; 6 National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to determine the best method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in different conditions. 【Method】 Taking the *Listeria monocytogenes* standard strain CMCC54004, commercial salted duck, and salad as research objects, selectively enrichment of detection samples were conducted and artificially contaminated negative samples according to national standards. Detection results of *L. monocytogenes* protein detection method, CPA isothermal amplification method, and real-time fluorescence PCR method were compared and verified with traditional flat separation process. 【Result】 Protein detection method was simple in operation with low sensitivity of 10^6 cfu/mL. Real-time fluorescence

【收稿日期】 2013-05-22

【基金项目】 国家质检总局课题(2012IK168); 现代农业产业技术体系专项(CARS-42-G22); 动物源食品安全加工科技工程项目(2012BAD28B00); 青奥会食品安全保障关键技术应用与示范项目(2011BAK21B05)

【作者简介】 周 阳(1988—), 男, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要从事食品科学与安全研究。E-mail: zy783499174@126.com

【通信作者】 付瑞燕(1976—), 女, 上海人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: ruiyanfu@189.cn

PCR method had high sensitivity of 10^1 cfu/mL, but it was cumbersome to operate and required high operation techniques and laboratory conditions. CPA isothermal amplification method had relatively high sensitivity of 10^5 cfu/mL and simple operation requirement. 【Conclusion】 The real-time fluorescent PCR method was suitable for high sensitivity with good experimental conditions. CPA isothermal amplification method was suitable for low-sensitivity requirement and simple laboratory conditions.

Key words: *Listeria monocytogenes*; comparison of test methods; protein detection method; CPA isothermal amplification method; real-time fluorescent PCR method

单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是一种重要的人畜共患病致病菌,主要污染肉类、乳制品和蔬菜等,从 20 世纪 90 年代起被世界卫生组织列为最重要的食源性病原菌之一^[1-3]。LM 对环境的耐受性很强,具有耐盐、耐低温的特点,在冷藏温度下仍然可以大量繁殖,引起动物和人类流产、败血症、脑膜炎等疾病^[4-7]。近年来,多次发生由 LM 引起的食源性疾病暴发并造成部分患者死亡,因此引起了世界各国的高度关注^[8-9]。

目前,LM 的检验仍以传统培养方法为主,这种方法操作繁琐,耗时长,不能实现快速筛查^[10-11]。在此情况下,基于免疫学与分子生物学的快速检测技术得以迅速发展,对食源性致病菌的检测起到了重要作用。本试验选取 RapidChek® 李斯特菌蛋白条、CPA 恒温扩增法^[12-13]和实时荧光 PCR 方法^[14]检测样品中的 LM,以筛选适用于不同条件且快速有效、实用性强的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 单增李斯特氏菌标准菌株 CMCC 54004,由江苏出入境检验检疫局购自中国医学细菌菌种保藏管理中心。供检新鲜样品盐水鸭、凉拌菜各 200 g,购自超市。

1.1.2 培养基 单增李斯特氏菌增菌肉汤 LB₁ 和 LB₂(北京陆桥),胰蛋白胨大豆琼脂(TSA,美国 OXOID),胰蛋白胨大豆营养肉汤(TSB,美国 OXOID),PALCAM 琼脂(美国 OXOID),李斯特显色培养基(法国科玛嘉)。

1.1.3 试剂 蛋白酶 K(20 mg/mL),无水乙醇,细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱)(Cat. # DP302,天根公司),RapidChek® 李斯特菌检测试剂盒(产品编号 7000171),李斯特菌核酸检测试剂盒(恒温扩增-试纸条法)(杭州优思达生物技术有限公司),单增李斯特氏菌实时荧光 PCR 检测试剂盒(上海辉睿生物科技有限公司,Cat. # BD-I-303)。

1.1.4 仪器 恒温振荡金属浴(博日 MB-102)、高速离心机(Thermo Scientific Biofuge Stratos)、常规 PCR 仪(Eppendorf 5331/5332 Gene Genies)、实时荧光 PCR 扩增仪(Roche LightCycler 480 II)和电动移液器等。

1.2 试验方法

1.2.1 阴性样品的确认 按照国家食品安全标准 GB 4789.30—2010^[15]对供检的盐水鸭、凉拌菜样品进行增菌,然后利用实时荧光 PCR 方法对增菌液进行快速筛选,同时涂布 PALCAM 琼脂和李斯特显色培养基平板进行菌落分离,选取检测结果为阴性的样品用于后期人工布菌试验。

1.2.2 阴性样品增菌培养及 LM 标准菌株增菌液的制备 为了对 3 种快速检测方法进行比较,需要对 1.2.1 中得到的阴性样品进行增菌培养,然后与 LM 标准菌株纯培养物的梯度稀释液混合,制备检测样本。具体操作如下:将阴性样品用 LB₁ 增菌肉汤进行增菌,(30±1)℃培养 24 h;从 LB₁ 增菌后的菌液中吸取 1 mL 至盛有 100 mL LB₂ 增菌肉汤的锥形瓶中,(30±1)℃培养 24 h,得到样品增菌液;同时,用胰蛋白胨大豆营养肉汤对标准菌株 CMCC 54004 进行增菌,(37±1)℃培养 24 h,获得 LM 标准菌株增菌液。

1.2.3 LM 标准菌株梯度稀释液的制备及样品布菌 对标准菌株 CMCC 54004 的增菌液进行 10 倍梯度稀释(增菌液在稀释前用振荡器将菌悬液充分振匀),将 $10^0 \sim 10^7$ 倍稀释的菌液按照每管 100 μ L 分装至 1.5 mL 的离心管中,每个稀释度准备 6 份备用。为了解标准菌株纯培养物的生长情况,吸取 100 μ L $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 梯度的稀释菌液(涂布前必须将其各自充分混匀)均匀涂布于胰蛋白大豆琼脂(TSA)上,每个梯度涂布 3 块平板,(37±1)℃培养 24 h 后计数,取平均值。

取 1.2.2 中的样品增菌液 900 μ L 至 1.5 mL 离心管中,然后加入 100 μ L 标准菌株纯培养物的各梯度稀释液(分装前阴性样品增菌液和标准菌株增菌

液均需充分混匀),得到混合菌液,振荡混匀,12 000 g 离心 10 min,弃上清,备用。

1.2.4 核酸提取 取 3 份 1.2.3 中制备的混合菌液,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱)提取核酸备用,具体操作步骤按照产品说明书进行。

1.2.5 蛋白条检测 取 3 份混合菌液,用 400 μ L 生理盐水悬浮沉淀,沸水浴 10 min,冷却至室温,然后用蛋白检测试纸条进行快速检测,以无菌水作阴性对照,以标准菌株纯培养物作阳性对照,具体操作见说明书。

1.2.6 CPA 恒温扩增法^[12-13]检测 取出装有玻璃化试剂的反应管,每管加入 15 μ L 复溶缓冲液(包括 dNTP、Mg²⁺、PCR 反应预混液等),然后滴加 20 μ L 的石蜡油,室温静置 2~3 min 以促进玻璃化试剂的充分溶解。此后,按照试剂盒说明书操作,并设置阴、阳性对照(阴性对照加入 4 μ L 无菌水,阳性对照加 4 μ L 标准菌株纯培养物)。将反应管置于常规 PCR 仪或恒温仪上,63 $^{\circ}$ C 反应 45 min,将扩增后的反应管放入固定盒中,合上固定盒后将其装入装置外盒,在 15~30 min 观察并记录检测结果,30 min 后判读结果无效。观察 3 次平行试验的检测结果,拍照记录试验结果。

1.2.7 实时荧光 PCR 方法^[14]检测 选用 LM 实时荧光 PCR 检测试剂盒对提取的核酸进行检测评估。总反应体系 25 μ L:包括 12.5 μ L LM PCR 反应液 I (主要包括 PCR 反应预混液、dNTP、Mg²⁺

等),4 μ L LM PCR 反应液 II (主要包括引物、探针),3.5 μ L 灭菌蒸馏水,5.0 μ L DNA 模板(以无菌水作阴性对照,以标准菌株纯培养物作阳性对照)。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,58 $^{\circ}$ C 复性 45 s,收集荧光信号,50 个循环;40 $^{\circ}$ C 冷却 40 s。将 3 次平行试验反应结束后的 Ct 值取平均值,并进行结果分析。

1.2.8 传统平板分离方法检测 利用 LM 显色平板将标准菌株梯度稀释液以及 1.2.3 中得到的混合菌液分别划线培养,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,每个平板挑取 5 个可疑菌落,利用实时荧光 PCR 进行快速检测,同时在 TSA 培养基上划线纯化培养,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后进行生化鉴定。

2 结果与分析

2.1 LM 标准菌株的平板计数

平板计数结果显示,100 μ L 经 10⁷ 倍稀释后的 LM 菌液平板计数的平均值为 5,所对应的细菌数量级为 10⁰;经 10⁶ 倍稀释后的菌液平板计数的平均值为 44,所对应的细菌数量级为 10¹;经 10⁵ 倍稀释后的菌液平板计数的平均值为 453,所对应的细菌数量级为 10²。依此类推,经 10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ 倍稀释后对应的细菌数量级分别为 10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷。

2.2 LM 的蛋白条检测

不同样品中 LM 的蛋白条检测结果见图 1。

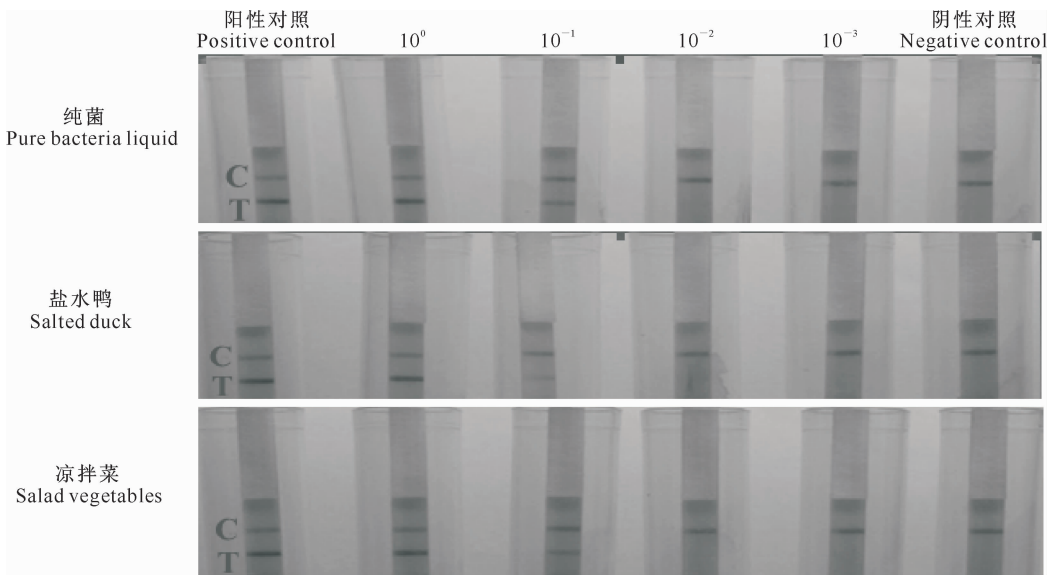


图 1 不同样品中单增李斯特氏菌的蛋白条检测结果

Fig. 1 Protein detection results of *Listeria monocytogenes* in different samples

由图 1 可知,LM 蛋白检测试纸条的质控线(即 C 线)正常,表明检测结果可靠。在 LM 纯菌增菌

液、盐水鸭和凉拌菜基质中的最低检测限为 10^{-1} ，即菌体数量级在 10^6 时检测线(即 T 线)明显，可检测出食品中的 LM。该法操作简单，只需通过观察质控线和检测线即可判定结果，但检测灵敏度太低。

2.3 LM 的 CPA 恒温扩增检测

由图 2 可知,CPA 恒温扩增快速检测试纸条的质控线(即 C 线)正常,表明检测结果可信。在纯菌

增菌液中该方法的检测限为 10^{-3} ，即当菌体数量级为 10^4 时检测线(即 T 线)明显，此时可检测出食品中的 LM；在盐水鸭和凉拌菜基质中，检测限为 10^{-2} ，略低于纯菌，说明食品基质中不同成分对 LM 的 CPA 恒温扩增法存在一定干扰，但影响程度很小，在实际检测工作中的实用性较强。

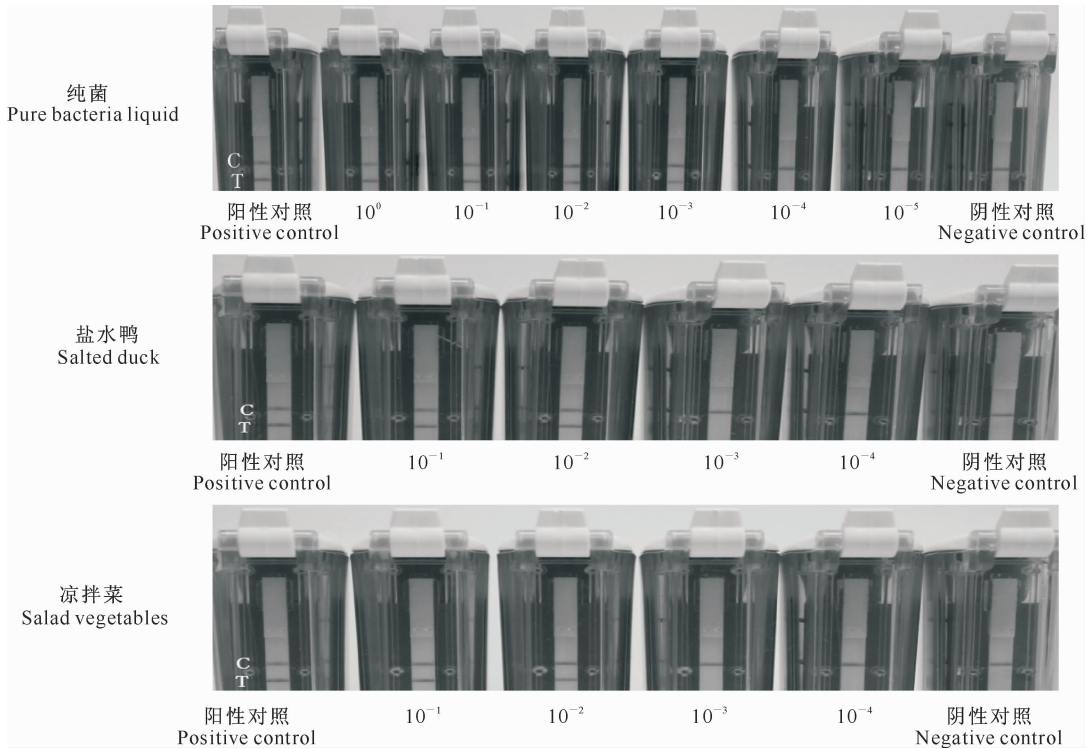


图 2 不同样品中单增李斯特氏菌的 CPA 恒温扩增检测结果

Fig. 2 CPA isothermal amplification detection results of *Listeria monocytogenes* in different samples

2.4 LM 的实时荧光 PCR 检测

由图 3 可知,经过天根离心柱法提取核酸后进行实时荧光 PCR 检测,阴性、阳性对照正常,扩增曲线典型。由表 1 可见,纯菌增菌液与 2 种食品基质的检测结果类似,检测灵敏度相同,最低检测限为 10^{-6} (即菌体数量级为 10^1)时仍可检出食品中的 LM,检测灵敏度高,结果准确,非常适合对含有少量 LM 样品的检测。

2.5 3 种 LM 快速检测方法的比较与验证

由以上结果可知,利用实时荧光 PCR 方法检测 LM 的灵敏度最高,当增菌液中仅含有几十个目标菌时便可通过该方法检测出来,因此可以利用该方法对大量的检测样品进行初步筛选,然后利用传统方法进行试验结果的验证,从而进一步提高检测的准确性和检测效率;其次是 CPA 恒温扩增法,该方法的操作步骤相对简单,不需要荧光 PCR 仪等大型

仪器,比较适合基层实验室;灵敏度最低的是蛋白条检测法,该方法的操作步骤最为简单,无需进行细菌核酸的提取,也不需要大型的仪器,只需要进行煮沸即可进行目标菌的检测,但是当菌体含量较低时会影响检测结果的准确性。通过传统平板分离方法对检测结果进行验证,结果显示,试验中的样品增菌液在菌体数量级达到 10^4 时可以通过显色平板划线培养分离到 LM,从而进一步证实了以上 3 种检测方法的可行性。

3 结论与讨论

目前,在 LM 的快速检测方法中,免疫学检测方法和分子生物学检测方法应用较为广泛。由于 ELISA 法操作繁琐,检测过程耗时长,因此本试验选取了 LM 蛋白条检测法;分子生物学检测方法选取了 CPA 恒温扩增法和实时荧光 PCR 方法。

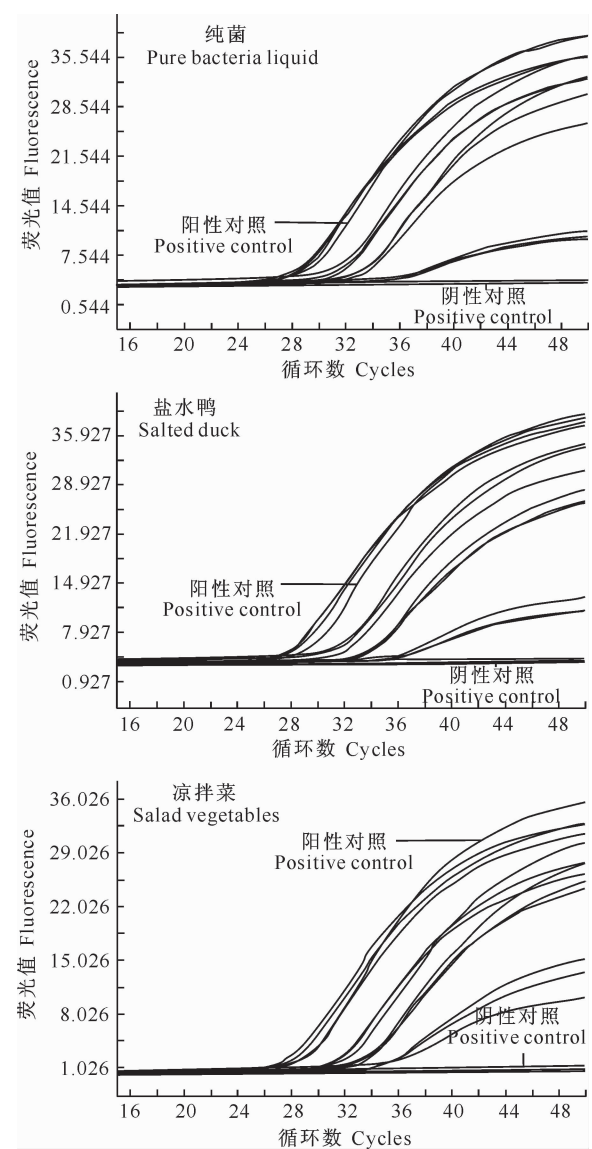


图 3 不同样品中单增李斯特氏菌的实时荧光 PCR 检测结果

A,B,C 中 4 组阳性曲线(每组含 3 个平行)对应的菌体数量级从左至右依次为 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1

Fig. 3 Real-time fluorescence PCR detection results of *Listeria monocytogenes* in different samples

The orders of magnitude of the corresponding bacteria in the four groups of positive curves (each group has three replicates) of A,B, and C from left to right are 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10^1 , respectively

本试验通过比较 3 种快速检测方法发现,蛋白条检测法虽然操作简单,但容易受到菌体数量以及检测蛋白种类的影响,检测灵敏度低,在实际样品检测中应用性差;CPA 恒温扩增法仅需具备恒温功能的相关仪器就可以进行 PCR 反应,操作简单,既克服了蛋白条检测灵敏度低的缺点,又不需要先进的实验仪器,降低了实验成本,缩短了检测周期,提高

了检测效率,其中玻璃化 DNA 聚合酶保存技术实现了试剂盒的常温运输,密闭的一次性核酸检测装置有效地避免了扩增产物气溶胶扩散造成的污染和假阳性,可以通过检测试纸条直接对检测结果进行判读,比较适合基层实验室应用;实时荧光 PCR 方法的特异性好,检测灵敏度高,最低检测限可达到几十个菌,同时还避免了常规 PCR 必需的电泳过程,缩短了检测周期,极大地降低了交叉污染的风险,能较好地完成实际样品的检测,但操作比较繁琐,对实验条件、仪器及实验人员的操作水平要求较高,适用于实验条件比较优越的实验室。

表 1 不同样品中单增李斯特氏菌检测的实时荧光 PCR 反应的 C_t 值

Table 1 C_t value of real-time fluorescence PCR reaction in different samples					
样品 Sample	菌体数量级 Order of magnitude of bacteria	C_t			平均 Average
		1	2	3	
纯菌 Pure bacteria liquid	10^0		—		—
	10^1	35.57	35.35	35.74	35.55
	10^2	33.05	32.76	33.42	33.08
	10^3	31.12	31.76	31.39	31.42
	10^4	27.35	28.50	27.82	27.89
盐水鸭 Salted duck	10^0		—		—
	10^1	38.11	37.52	37.79	37.81
	10^2	34.51	34.27	34.39	34.39
	10^3	32.50	31.71	31.43	31.88
	10^4	28.36	28.59	28.35	28.43
凉拌菜 Salad vegetables	10^0		—		—
	10^1	37.64	38.03	37.66	37.78
	10^2	33.40	33.31	33.74	33.48
	10^3	31.89	30.73	31.51	31.38
	10^4	28.63	28.79	28.41	28.61
阴性 Negative			—		—
阳性 Positive			—		29.36

注:“—”表示检测结果为阴性。
Note:“—”means negative.

本试验结果表明,CPA 恒温扩增法和实时荧光 PCR 方法检测效果较好,周期短,检测效率高。同时通过与传统平板分离鉴定方法的对比,证实了 2 种快速检测方法的可行性,为不同水平的实验室进行检测提供了较好的选择,在实际检测中可以将快速检测方法与传统方法进行有机结合,构建比较完备的检测体系,从而极大地提高检测效率。

[参考文献]

[1] Oevermann A, Zurbruggen A, Vandeveldel M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants; A zoonosis on the rise [J]. Interdisciplinary Perspect Infect on Infectious Diseases, 2010, 11(5): 142-168.

- [2] Freitag N C, Port G C, Miner M D. Listerial monocytogenes from saprophyte to intracellular pathogen [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 7(9): 623-637.
- [3] Jackson K A, Iwamoto M, Swerdlow D. Pregnancy-associated listeriosis [J]. *Epidemiol Infect*, 2010, 17: 1-7.
- [4] 刘书花, 李福伟, 李 剑, 等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌快速检测方法的建立 [J]. *现代农业科技*, 2010(22): 352-353.
Liu S H, Li F W, Li J, et al. The establishment of a rapid detection method of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2010(22): 352-353. (in Chinese)
- [5] 李 丽, 刘 洁, 赵剑虹. 单核细胞增生性李斯特菌 PCR 快速检测方法的建立及在朝阳区大中型宾馆食品卫生监测中的应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(10): 2027-2029.
Li L, Liu J, Zhao J H. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR and application to food safety monitoring in Chaoyang District [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(10): 2027-2029. (in Chinese)
- [6] 徐本锦, 李新平, 王 新, 等. 陕西杨陵区市售食品中单增李斯特菌污染状况的调查与分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 40(10): 129-134.
Xu B J, Li X P, Wang X, et al. Survey of *Listeria monocytogenes* from retail food in Yangling, Shaanxi [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2012, 40(10): 129-134. (in Chinese)
- [7] 程媛媛, 张彦明, 向 华, 等. 牛奶中布鲁氏菌和单增李斯特菌双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(3): 54-60.
Cheng Y Y, Zhang Y M, Xiang H, et al. Establishment of multiplex PCR for detecting *Brucella* and *Listeria monocytogenes* in raw milk [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2011, 39(3): 54-60. (in Chinese)
- [8] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy-Massachusetts [J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2008, 57(40): 1097-1100.
- [9] Gilmour M W, Graham M, Domselaar G V, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 120-135.
- [10] 王 冰, 扈庆华, 石晓路, 等. 产单核李斯特菌的改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测体系的建立 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36(13): 2512-2514.
Wang B, Hu Q H, Shi X L, et al. Establishment of rapid detection system of *Listeria monocytogenes* with modified molecular beacons PCR immunomagnetic beads capture [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2009, 36(13): 2512-2514. (in Chinese)
- [11] 侯进慧, 蔡 侃, 樊继强. 食源性致病细菌检测技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(7): 387-392.
Hou J H, Cai K, Fan J Q. Research progress in detection techniques for foodborne pathogen [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(7): 387-392. (in Chinese)
- [12] Xu G L, Hu L, Zhong H Y, et al. Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 246.
- [13] 易海华, 祝长青, 宋阳威, 等. 食品中单增李斯特菌环介导等温扩增检测技术 [J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 203-207.
Yi H H, Zhu C Q, Song Y W, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science*, 2011, 32(4): 203-207. (in Chinese)
- [14] 索 标, 滕要辉, 艾志录, 等. 食源性致病菌多重实时荧光 PCR 检测扩增内标的构建及评价 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(8): 148-151.
Suo B, Teng Y H, Ai Z L, et al. Construction and evaluation of an internal amplification control for multiplex realtime PCR detection of foodborne pathogens [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(8): 148-151. (in Chinese)
- [15] GB 4789. 30—2010 食品微生物学检验: 单核细胞增生李斯特氏菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
GB 4789. 30—2010 Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes* [S]. Beijing: China Standard Press, 2010. (in Chinese)