



产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌多重荧光定量 PCR 方法的建立及应用

尚和卫¹,李文豪¹,谢梦圆¹,郭宇²,苏胜杰²,云涛²,高登军²,王建龙²,徐晓静^{1*}

(1.内蒙古农业大学 兽医学院,呼和浩特 010018; 2.内蒙古自治区动物疫病预防控制中心,呼和浩特 010018)

中图分类号: S851.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)17-0078-05

摘要: 为了建立能同时检测产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌的多重荧光定量 PCR 方法,试验根据 GenBank 中产肠毒素大肠杆菌 ST 和 LT 基因及沙门氏菌 *invA* 基因序列设计引物和探针,通过优化扩增体系中引物和探针剂量建立检测产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌的多重荧光定量 PCR 方法,分析该方法的特异性、敏感性和重复性,用建立的方法对 85 份临床样品进行检测,并与实验室传统血清学分离鉴定方法进行比较。结果表明: 在 ST 基因的最佳引物和探针剂量为 0.4 μ L、0.8 μ L,LT 基因的最佳引物和探针剂量为 0.6 μ L、1.0 μ L,*invA* 基因的最佳引物和探针剂量为 1.0 μ L、1.2 μ L 时,扩增曲线良好,ST 基因、LT 基因、*invA* 基因的标准曲线回归方程相关系数(R^2) 分别为 0.975,0.968,0.915,扩增曲线具有良好线性关系;建立的多重荧光定量方法对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等细菌核酸无交叉反应;组内重复变异系数均低于 2%,且产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌的最低检出浓度均为 1×10^1 copies/ μ L;从 85 份临床样品中检出产肠毒素大肠杆菌 20 份,沙门氏菌阳性样品 10 份,双阳性样品 2 份,与实验室传统血清学分离鉴定方法的符合率为 94.12%。说明试验建立的多重荧光定量 PCR 方法的特异性好、敏感性强、稳定性高,具有良好的使用前景。

关键词: 产肠毒素大肠杆菌;沙门氏菌;ST 基因;LT 基因;*invA* 基因;多重荧光定量 PCR

开放科学(资源服务)标识码
Open Science Identity (OSID)



腹泻是危害畜禽养殖业的重要疾病之一。据报道,细菌、病毒及寄生虫均可引起畜禽腹泻^[1],由细菌引起的畜禽腹泻占众多因素的 30% 以上^[2]。在细菌性腹泻中,大肠杆菌和沙门氏菌引起的腹泻位居首位^[3]。产肠毒素大肠杆菌是大肠杆菌腹泻最常见的病原^[4],其特点是能够产生两种类型的毒力因子,一种是促进与特定肠细胞受体结合的黏附素;另一种是负责液体分泌的肠毒素^[5]。肠毒素又包括两类,分别是热稳定肠毒素(ST)和热不稳定肠毒素(LT)^[6]。沙门氏菌是

革兰氏阴性杆菌,包含 2 600 多种血清型^[7],畜禽感染后的临床症状一般表现为腹泻、脱水、体温升高、精神不振,其中腹泻以带脓血和肠黏膜组织的稀样便或水样便为主,传染性较强,急性发病会迅速死亡^[8]。本研究根据 GenBank 中产肠毒素大肠杆菌 ST 和 LT 基因及沙门氏菌 *invA* 基因序列设计引物和探针,通过优化扩增体系中引物和探针剂量建立用于检测产肠毒素大肠杆菌及沙门氏菌的多重荧光定量 PCR 方法,以期对上述病原菌的快速、准确检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株、核酸及样品

产肠毒素大肠杆菌 CVCC 209 株(血清型为 O20,产生 ST)、CVCC 216 株(血清型为 O8,产生 LT)、大肠杆菌质控菌株 ATCC 25922 及肠炎沙门氏菌 CVCC 2184 株,均购自中国兽医微生物菌种管理保藏中心;牛曼氏杆菌(Mh)、多杀性巴氏杆菌 A 型(PmA)、多杀性巴氏杆菌 B 型(PmB)、牛羊产气荚膜梭菌 A 型(CpA)、牛羊产气荚膜梭菌 B 型(CpB)、牛羊产气荚膜梭菌 D 型(CpD)、铜绿假单胞菌、金黄色

收稿日期: 2022-07-23; 修回日期: 2023-06-08

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2020ZD0006); 内蒙古自治区奶牛疫病防控技术创新研发项目; 呼和浩特市重大科技专项(2022-农-重-1-1); 呼和浩特市科技创新领域人才项目(2022RC-联合体-1)

作者简介: 尚和卫(1998—),男,硕士研究生,研究方向为动物组织胚胎发育及疫病防控,719416135@qq.com.

* 通信作者: 徐晓静(1972—),女,教授,博士,博士生导师,研究方向为动物组织胚胎发育及疫病防控,xuxiaojing72@sina.com.



葡萄球菌的核酸,均由金宇保灵生物制品有限公司馈赠。

用于临床检测的 85 份牛粪便样品,采自内蒙古呼和浩特地区某规模化牛场。

1.2 主要试剂及仪器

Premix Taq™、Premix Ex Taq (Probe qPCR)、DL-500 Marker、pMD-19T 载体、大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,均购自 TaKaRa 公司; DNA 提取试剂盒,购自哈尔滨元亨生物药业有限公司; 质粒小量提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪,购自美国 Applied Biosystems 公司; 掌上离心机,购自美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 引物及探针的设计

根据 GenBank 中产肠毒素大肠杆菌毒力基因 ST 和 LT 基因及沙门氏菌毒力基因 invA 基因的序列,设计特异性引物和探针(见表 1),其中 ST-P 5' 端的荧光报告基因为 CY5,3' 端的荧光淬灭基因为 BHQ1; LT-P 5' 端的荧光报告基因为 ROX,3' 端的荧光淬灭基因为 BHQ2; invA-P 5' 端的荧光报告基因为 HEX,3' 端的荧光淬灭基因为 BHQ3。引物及探针均由生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌特异性引物及探针序列信息

Table 1 Specific primer and probe sequence information of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella*

引物/ 探针	序列	预扩增片 段大小/bp
ST-F	5'-GTCAACTGAATCACTTGACTCTTC-3'	147
ST-R	5'-GCACAGGCAGGATTACAACAA-3'	
ST-P	5'-CAACTGAATCACTTGACTCTT-3'	
LT-F	5'-ATGGCTCCTCAGTCTATTACAGA-3'	242
LT-R	5'-GTCTCGGTCAGATATGTGATTCTT-3'	
LT-P	5'-CCGGGACTTCGACCTGAAATGTTGC-3'	
invA-F	5'-CACGCTCTTTCGCTGGCATT-3'	464
invA-R	5'-TAGACAGGGCGGAGGACAAATC-3'	
invA-P	5'-CCTACCATACGGGCCATTGTGTC-3'	

1.4 阳性质粒的构建

按照 DNA 提取试剂盒说明书提取参考菌株 CVCC 209、CVCC 216 和 CVCC 2184 的 DNA 并作为模板,用表 1 的引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(总体积为 25 μL): Premix Taq™ 12.5 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 2 μL, RNase-free H₂O 8.5 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 20 s, 56 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 再延伸 7 min。回收、纯化 PCR 产物并与 pMD-19T 载体连接,将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感

受态细胞中,挑取阳性克隆接种于 LB 液体培养基中,以培养后的菌液为模板进行 PCR 扩增,参照质粒小量提取试剂盒说明书提取质粒并进行 PCR 鉴定,并将阳性质粒送至深圳华大基因股份有限公司测序,测序结果与 GenBank 中公布的基因序列进行比对分析,计算阳性质粒的拷贝数。将阳性质粒于 -20 ℃ 保存,备用。

1.5 多重荧光定量 PCR 方法的建立

1.5.1 扩增体系的优化 多重荧光定量 PCR 扩增体系: Premix Ex Taq(Probe qPCR) 12.5 μL, 上下游引物及探针的使用剂量见表 2, DNA 模板 2 μL, 用 RNase-free H₂O 补充至 25 μL。多重荧光定量 PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 20 s, 56 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 共 30 个循环。

表 2 引物/探针的优化

Table 2 Primer/probe optimization							μL
序号	ST-F/R	ST-P	LT-F/R	LT-P	invA-F/R	invA-P	
1	0.6	0.4	0.6	0.6	0.8	0.8	
2	0.4	0.6	0.8	0.6	0.8	0.8	
3	0.2	0.8	1.0	0.6	0.8	0.8	
4	0.6	0.4	0.8	0.8	1.0	1.0	
5	0.4	0.6	0.6	0.8	1.0	1.0	
6	0.2	0.8	1.0	0.8	1.0	1.0	
7	0.6	0.4	0.6	1.0	1.2	1.2	
8	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.2	
9	0.2	0.8	1.0	1.0	1.2	1.2	

1.5.2 标准曲线的绘制 选择 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/μL 共 8 个浓度的阳性质粒作为模板,每个模板重复 3 次,同时以 ddH₂O 为阴性对照。

1.5.3 敏感性试验 选择 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ copies/μL 阳性质粒作为模板,每个模板重复 3 次,同时以 ddH₂O 为阴性对照。采用建立的多重荧光定量 PCR 方法进行扩增,验证该方法的敏感性。

1.5.4 特异性试验 以铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、Mh、PmA、PmB、CpA、CpB、CpD、CVCC 209、CVCC 216、CVCC 2184、ATCC 25922 的核酸为模板,以 1×10^7 copies/μL ST 基因、LT 基因、invA 基因的阳性质粒分别作为阳性对照,并以 ddH₂O 为阴性对照,采用建立的多重荧光定量 PCR 方法进行扩增,验证该方法的特异性。

1.5.5 重复性试验 选择 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^4$ copies/μL 阳性质粒作为模板,每个模板重复 3 次,同时以 ddH₂O 为阴性对照,采用建立的多重荧光定量 PCR 方法进行扩增,验证该方法的稳定性。

1.6 临床样品的检测

采用本研究建立的产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌多重荧光定量 PCR 方法及实验室传统血清学分离

鉴定方法对采集的 85 份牛粪便样品进行检测,并比较二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 阳性质粒的构建

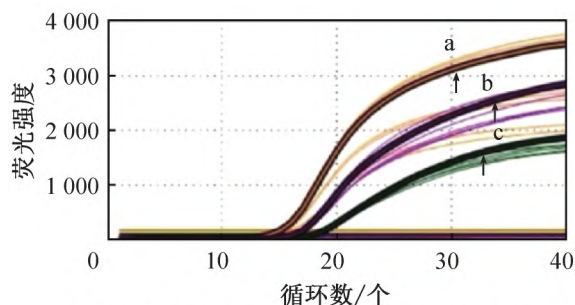
PCR 扩增结果显示: ST 基因、LT 基因、invA 基因阳性质粒的拷贝数分别为 3.22×10^{10} , 3.20×10^{10} , 3.19×10^{10} copies/ μL 。

2.2 多重荧光定量 PCR 方法的建立

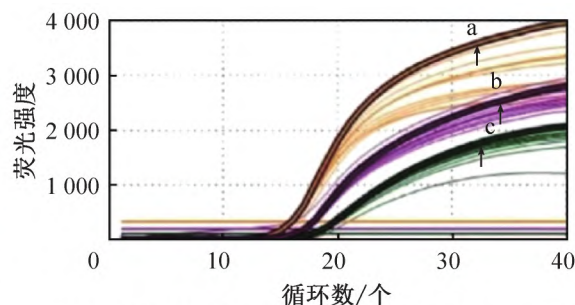
2.2.1 扩增体系的优化 优化结果(见图 1)显示: ST 基因的最佳引物剂量为 0.4 μL ,最佳探针剂量为

0.8 μL ; LT 基因的最佳引物剂量为 0.6 μL ,最佳探针剂量为 1 μL ; invA 基因的最佳引物剂量为 1.0 μL ,最佳探针剂量为 1.2 μL 。以最佳引物和探针剂量对各基因进行扩增得到的扩增曲线良好。

最终的多重荧光定量 PCR 扩增体系: Premix Ex Taq(Probe qPCR) 12.5 μL , ST-F 0.4 μL , ST-R 0.4 μL , ST-P 0.8 μL , LT-F 0.6 μL , LT-R 0.6 μL , LT-P 1 μL , invA-F 1 μL , invA-R 1 μL , invA-P 1.2 μL , DNA 模板 2 μL ,用 RNase-free H_2O 补充至 25 μL 。



A 引物剂量的优化(加粗曲线为最优, ↑ 所示)



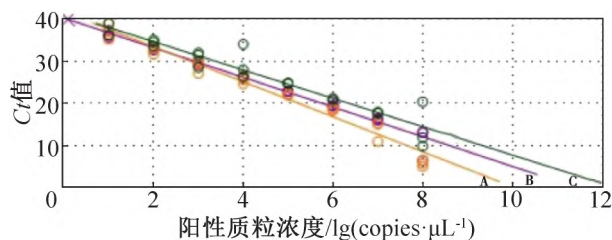
B 探针剂量的优化(加粗曲线为最优, ↑ 所示)

a.LT 基因; b.ST 基因; c.invA 基因。

图 1 产肠毒素大肠杆菌 ST 基因、LT 基因和沙门氏菌 invA 基因多重荧光定量 PCR 引物和探针剂量的优化结果

Fig.1 Optimization results of the primer and probe amounts of multiplex fluorescent quantitative PCR for enterotoxigenic *Escherichia coli* ST gene, LT gene and *Salmonella* invA gene

2.2.2 标准曲线的绘制 用优化后的扩增体系进行多重荧光定量 PCR 扩增,绘制标准曲线,见图 2。ST 基因的标准曲线回归方程为 $y = -3.524x + 40.237$, $R^2 = 0.975$,扩增效率(E)为 92.2%; LT 基因的标准曲线回归方程为 $y = -4.153x + 41.710$, R^2 为 0.968, E 为 74.1%; invA 基因的标准曲线回归方程为 $y = -3.365x + 41.347$, $R^2 = 0.915$, E 为 98.2%。



A.LT 基因; B.ST 基因; C.invA 基因。

图 2 多重荧光定量 PCR 标准曲线

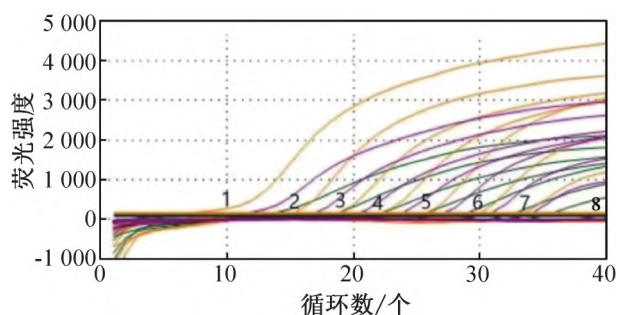
Fig.2 Standard curve of multiplex fluorescent quantitative PCR

2.2.3 敏感性试验 结果见图 3。

由图 3 可知,产肠毒素大肠杆菌 ST 基因、LT 基因和沙门氏菌 invA 基因的最低检出浓度均为 1×10^1 copies/ μL ,说明本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法敏感性高。

2.2.4 特异性试验 结果见图 4。

由图 4 可知,仅有 ST 基因、LT 基因、invA 基因的



1~7.1×10⁷~1×10¹ copies· μL^{-1} ; 8.阴性对照。

图 3 多重荧光定量 PCR 敏感性检测结果

Fig.3 Sensitivity test results of multiplex fluorescent quantitative PCR

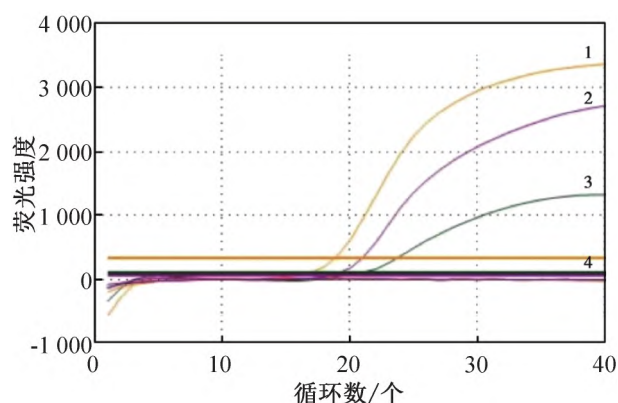
阳性质粒出现扩增曲线,说明本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法具有良好的特异性。

2.2.5 重复性试验 结果见图 5。

由图 5 可知: ST 基因、LT 基因、invA 基因同一浓度模板 C_t 值基本一致,扩增曲线也大致相同;组内重复变异系数均低于 2%,说明本研究建立的多重荧光定量 PCR 方法的重复性高,稳定性良好。

2.3 临床样品的检测

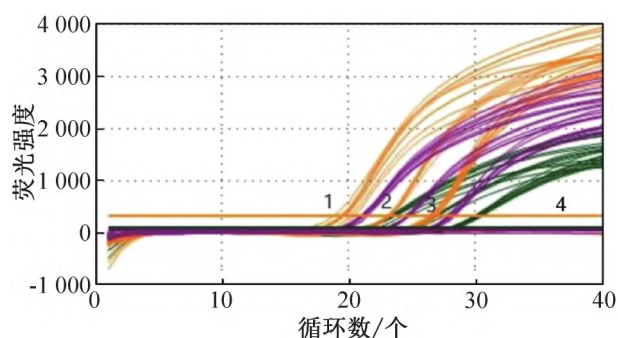
多重荧光定量 PCR 方法的检测结果(见图 6)显示,从 85 份牛粪便样品中检出产肠毒素大肠杆菌阳性样品 20 份(23.53%),沙门氏菌阳性样品 10 份(11.76%),双阳性样品 2 份。传统血清学分离鉴定



1.CVCC 209; 2.CVCC 216; 3.CVCC 2184; 4.阴性对照
(ATCC 25922、Mh、PmA、PmB、CpA、CpB、CpD、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌)。

图4 多重荧光定量PCR特异性检测结果

Fig.4 Specificity test of multiplex results fluorescent quantitative PCR

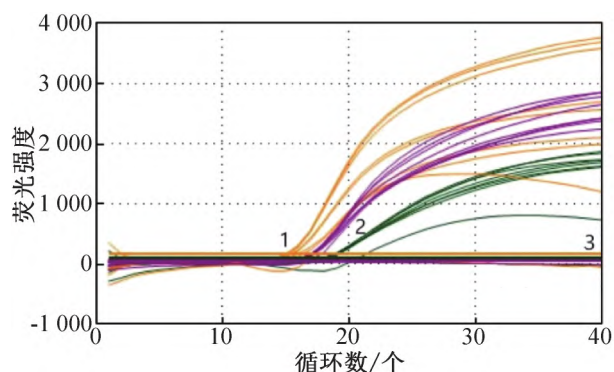


1~3.1×10⁶~1×10⁴ copies·μL⁻¹; 4.阴性对照。

图5 多重荧光定量PCR重复性检测结果

Fig.5 Results of reproducibility test of multiplex fluorescent quantitative PCR

结果显示:从85份牛粪便样品中检出产肠毒素大肠杆菌阳性样品22份(25.88%),沙门氏菌阳性样品10份(11.76%),双阳性样品2份。两种方法的符合率为94.12%。说明本研究建立的产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌多重荧光定量PCR方法的检测结果较可靠,准确性较高,可用于临床检测。



1.阳性质粒; 2.临床样品; 3.阴性对照。

图6 临床样品的检测结果

Fig.6 Determination results of clinical samples

3 讨论与结论

产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌是导致人和动物腹泻的主要细菌性肠道病原体^[9-10]。在畜禽动物中,仔猪和犊牛易受到产肠毒素大肠杆菌的侵袭,其感染导致幼畜发育不良,死亡率飙升,给世界各国猪和牛的养殖造成极大的经济损失^[11]。沙门氏菌是一种高度拟合的环境微生物,可在土壤、灰尘、海洋地表水中持续存在^[12],伺机侵袭易感动物。上述两种病原菌严重阻碍了畜牧养殖业的持续健康发展。

回顾传统的产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌的检测方法,利用光学显微镜观察细菌形态学结构并作出判定,其敏感性和特异性均较低;生化鉴定一般需要进行十几种试剂的生化试验,最后依据结果逐个判定,操作步骤复杂繁琐,并且如果出现个别生化试验结果不符合判定标准时会影响最终结果;血清学试验也会因交叉抗体反应等原因导致出现假阳性结果,且生化鉴定与血清学试验都需要对样品进行增菌纯化培养及划线培养,进一步延长了检测时间。而本研究建立的产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌多重荧光定量PCR方法的前期准备过程简单,检测时间约为1h,且对操作人员自身专业技术能力和工作经验要求较低,可从大批次样品中同时筛检出上述两种致病菌,减少人力、物力的成本投入,且极大地缩短了检测时间。

本研究建立的多重荧光定量PCR方法对产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌的最低检出浓度均为 1×10^1 copies/μL,比王芳^[13]采用SYBR Green I荧光定量PCR方法对产肠毒素大肠杆菌的最低检出浓度 4.09×10^3 copies/μL、王华健等^[14]采用TaqMan多重荧光定量PCR方法对沙门氏菌的最低检出浓度 1×10^4 copies/μL均低,说明本研究建立的方法敏感性高。临床样品检测结果显示,在内蒙古呼和浩特地区采集的样本中,产肠毒素大肠杆菌的检出率为25.53%,沙门氏菌检出率为11.76%。杨德鸿^[15]利用16S rRNA测序鉴定方法对苏北地区猪场进行产肠毒素大肠杆菌的流行病学调查,结果产肠毒素大肠杆菌的检出率为25.1%;宋美英^[16]对黑龙江、河北、山西、陕西、宁夏、安徽6个省(自治区)9个规模化奶牛养殖场进行大肠杆菌毒力因子的流行病学调查,结果112份病料中的毒力因子以K88、K99、F17、F41为主,表明分离的致病性大肠杆菌以产肠毒素大肠杆菌为主;王丽扬^[17]对苏皖地区1618份样品进行PCR检测,其中沙门氏菌的检出率为12.79%;孙璐等^[18]对山东地区995份肉鸡样本进行PCR检测,结果沙门氏菌的检出率为24.01%。以上研究结果说明产肠毒素大肠杆菌及沙门氏菌在内蒙古地区感染严重且流行广泛,因此必须加强对这两种病原菌的监测管理。



综上所述,本研究建立的产肠毒素大肠杆菌和沙门氏菌多重荧光定量 PCR 检测方法的敏感性强,特异性好,在大规模流行病学调查时具有较高的稳定性,使用前景良好。

参考文献:

- [1] 陈真强.犊牛腹泻的病因及防治措施探讨 [J].江西畜牧兽医杂志,2005(5) : 35.
- [2] 陆承平.兽医微生物学 [M].北京:中国农业出版社,2012.
- [3] BARKLEY J A,PEMPEK J A,BOWMAN A S,et al. Longitudinal health outcomes for enteric pathogens in preweaned calves on Ohio dairy farms [J].Prev Vet Med,2021,190: 105323.
- [4] NAGY B,FEKETE P Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine [J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295 (6) : 443 -454.
- [5] ZHANG Y C,TAN P, ZHAO Y, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota [J].Gut Microbes,2022,14(1) : 2055943.
- [6] KOPIC S,GEIBEL J P. Toxin mediated diarrhea in the 21 century: the pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. cholerae and rotavirus infection [J]. Toxins, 2010, 2 (8) : 2132 -2157.
- [7] YIN Y,ZHOU D. Organoid and enteroid modeling of *Salmonella* infection [J].Front Cell Infect Microbiol,2018,8: 102.
- [8] 严惠馨.动物沙门氏菌病的防治 [J].现代畜牧兽医,2018(3) : 28 -31.
- [9] 杨帆,王红宁,张安云,等.多重 PCR 检测病死鸡中沙门氏菌方法的研究 [J].四川大学学报(自然科学版),2015,52(1) : 163 -169.
- [10] BRANCHU P,BAWN M,KINGSLEY R A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathovariants [J].Infect Immun,2018,86(8) : e00079-18.
- [11] DUBREUIL J D. Pig vaccination strategies based on enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins [J]. Braz J Microbiol, 2021, 52 (4) : 2499 -2509.
- [12] BELL R L,ZHENG J,BURROWS E, et al. Ecological prevalence, genetic diversity, and epidemiological aspects of *Salmonella* isolated from tomato agricultural regions of the Virginia Eastern Shore [J]. Frontiers Microbiol,2015,6: 415.
- [13] 王芳.ETEC 肠毒素 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J].杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [14] 王华健,张宁,杨威,等.3 种食源性致病菌 TaqMan 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J].畜牧兽医学报,2022,53(4) : 1201 -1209.
- [15] 杨德鸿.苏北地区猪产肠毒素大肠杆菌(ETEC) 流行病学调查及灭活疫苗初步研究 [J].南京:南京农业大学,2018.
- [16] 宋美英.致病性牛源大肠杆菌毒力基因分子流行病学调查和耐药突变选择窗的应用 [J].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [17] 王丽扬.苏皖部分地区动物源沙门菌流行病学调查及复方白头翁散对其生物被膜形成的抑制作用 [J].扬州:扬州大学,2021.
- [18] 孙璐,王娟,黄秀梅,等.山东地区肉鸡屠宰环节沙门菌流行病学调查与毒力分析 [J].中国家禽,2015,37(7) : 67-70.

Establishment and application of multiplex fluorescent quantitative PCR method for enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella*

SHANG Hewei¹,LI Wenhao¹,XIE Mengyuan¹,GUO Yu²,SU Shengjie²,YUN Tao²,
GAO Dengjun²,WANG Jianlong²,XU Xiaojing^{1*}

(1.College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University,Huhot 010018,China;

2.Inner Mongolia Autonomous Region Animal Disease Control Center,Huhot 010018,China)

Abstract: In order to establish a multiplex fluorescent quantitative PCR method for the simultaneous detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella*, in this experiment, primers and probes were designed by using enterotoxigenic *Escherichia coli* ST gene and LT gene and *Salmonella* invA gene in GenBank and the amounts of primers and probes in the amplification system were optimized. Thus, a multiplex fluorescent quantitative PCR method for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* was established. Its specificity, sensitivity and repeatability were determined. Eighty-five clinical samples were tested using the established method, which was compared with traditional laboratory serological isolation and identification methods. The results showed that when the optimal primer and probe amounts for the ST gene of 0.4 μ L and 0.8 μ L respectively, the optimal primer and probe amounts for the LT gene of 0.6 μ L and 1 μ L respectively, and the optimal primer and probe amounts for the invA gene of 1.0 μ L and 1.2 μ L respectively, good amplification curves were obtained. The correlation coefficients (R^2) of the standard curve regression equations for ST gene, LT gene and invA gene were 0.975, 0.968 and 0.915, respectively, and the amplification curves had good linear relationships. The established multiplex fluorescent quantitative PCR method had no cross-reaction against bacterial nucleotides such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The coefficient of intra-batch repeat variation was less than 2%, and the lowest detection concentrations of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* were 1×10^1 copies/ μ L. From 85 clinical samples, 20 samples of enterotoxigenic *Escherichia coli*, 10 positive samples of *Salmonella* and 2 double positive samples were detected. The consistency rate with the traditional laboratory serological separation and identification methods was 94.12%. The results suggested multiplex fluorescent quantitative PCR method had good specificity, strong sensitivity, high stability, and good practical prospects.

Keywords: enterotoxigenic *Escherichia coli*; *Salmonella*; ST gene; LT gene; invA gene; multiplex fluorescent quantitative PCR (011)