

配方乳粉中 6 种致病菌双重酶促等温扩增快速检测方法 的建立

苗雅倩^{1,2,3#}, 杨艳歌^{2,3#}, 赵健淞^{2,3}, 魏莹^{2,3}, 王秀娟^{2,3}, 袁飞^{2,3}, 王正亮^{1*},
张峰^{2,3*}

1 中国计量大学 生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 浙江 杭州

2 中国检验检疫科学研究院, 北京

3 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全), 北京

苗雅倩, 杨艳歌, 赵健淞, 魏莹, 王秀娟, 袁飞, 王正亮, 张峰. 配方乳粉中 6 种致病菌双重酶促等温扩增快速检测方法的建立[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1319-1336.

MIAO Yaqian, YANG Yange, ZHAO Jiansong, WEI Ying, WANG Xiujuan, YUAN Fei, WANG Zhengliang, ZHANG Feng. A dual enzymatic recombinase amplification method for rapid detection of six foodborne pathogens in formula milk powder[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1319-1336.

摘要:【目的】建立一种双重快速检测方法, 旨在快速筛查配方乳粉中克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌等 6 种常见食源性致病菌。【方法】酶促等温扩增(enzymatic recombinase amplification, ERA)技术是一种新型等温扩增技术, 能在 25–42 °C 的条件下, 仅需 10–30 min 完成对微量 DNA 或 RNA 的指数级扩增。基于该技术, 本研究设计了针对克罗诺杆菌的 ERA 检测引物探针, 同时筛选适用于 ERA 检测体系的大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌的引物探针, 确定了每种单一菌种的 ERA 检测引物探针。通过引物探针的两两组合分析及方法优化, 建立双重 ERA 检测方法。通过人工模拟污染试验和实际样品检测, 确定双重 ERA 检测方法的检出限和准确性。【结果】建立了 3 组双重 ERA 法, 能够快速检测 6 种食源性致病菌, 检测时间仅需 16 min 10 s。灵敏度检测结果显示, 克罗诺杆菌和大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌 2 种组合的 DNA 检测灵敏度均为 1 ng/μL, 而沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌的 DNA 检测灵敏度为 10⁻¹ ng/μL。人工模拟污染试验显示, 该方法能检出的最低菌浓度为 1 CFU/mL。在 37 份临期市售配方乳粉中, 蜡样芽孢杆菌和单核增生李斯特氏菌的检出率分别为 37.84% 和 21.62%。与行业标准实时荧光 PCR 法的检测结果比对, 本研究建立的双重 ERA 检测

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1100900); 陕西省市场监督管理局科技计划(2023KY06)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100900) and the Science and Technology Plan of Shanxi Administration for Market Regulation (2023KY06).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Feng, fengzhang@126.com; WANG Zhengliang, wzl@cjlu.edu.cn

Received: 2024-09-18; Accepted: 2024-11-18; Published online: 2025-01-03

方法结果一致，证实了其准确性。【结论】本研究建立的双重 ERA 方法具有较高的特异性和灵敏度，从 DNA 提取到最终获得检测结果该方法仅需约 20 min，并能同时检测 6 种致病菌，显著提高了检测效率，对食源性致病菌的快速筛查具有重要意义。

关键词：配方乳粉；酶促等温扩增；食源性致病菌；快速检测

A dual enzymatic recombinase amplification method for rapid detection of six foodborne pathogens in formula milk powder

MIAO Yaqian^{1,2,3#}, YANG Yange^{2,3#}, ZHAO Jiansong^{2,3}, WEI Ying^{2,3}, WANG Xiujuan^{2,3}, YUAN Fei^{2,3}, WANG Zhengliang^{1*}, ZHANG Feng^{2,3*}

1 Zhejiang Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang, China

2 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing, China

3 Key Laboratory of the State Administration for Market Regulation (Food Quality and Security), Beijing, China

Abstract: [Objective] To establish a dual detection method for contaminations by six foodborne pathogens (*Cronobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes*) in formula milk powder in a rapid manner. **[Methods]** Enzymatic recombinase amplification (ERA) is a novel isothermal amplification technology that exponentially amplifies trace amounts of DNA or RNA in 10–30 min at 25–42 °C. The primers and probe of ERA for the detection of *Cronobacter* were designed. Meanwhile, the ERA primers and probes suitable for the detection of *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* were screened. Further, through pairwise combination and cross-reactivity analysis, as well as method optimization, the dual ERA detection system was established. The limit of detection and accuracy of the method were determined by application of this method in the detection of simulated contaminations and actual samples. **[Results]** Three groups of dual ERA systems were established, achieving the detection of six pathogens in 16 min 10 s. The established method showed the sensitivity of 1 ng/μL in the DNA detection of the combinations of *Cronobacter* with *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, and *S. aureus*, while it showed the sensitivity of 10⁻¹ ng/μL in the DNA detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes*. The results of the simulation contaminations showed that the limit of detection of the method was 1 CFU/mL. The dual ERA method established in this study was then adopted to detect 37 commercially available formula milk powder samples near the expiration date. The detection rates of *B. cereus* and *L. monocytogenes* were 37.84% and 21.62%, respectively. The results were consistent with those of the real-time PCR (industry standard method), confirming the accuracy of the dual ERA method established in this study. **[Conclusion]** The dual ERA method established in this study exhibits high specificity and high sensitivity. Moreover, it takes merely approximately 25 min from DNA extraction to obtaining the detection results, and it is capable of simultaneously detecting six pathogens, demonstrating high

efficiency. This method is of importance for the rapid screening of foodborne pathogens.

Keywords: formula milk powder; enzymatic recombinase amplification; foodborne pathogens; rapid detection

配方乳粉, 作为一种专为婴幼儿设计的食品, 其营养成分与母乳相似, 旨在满足婴幼儿生长发育所需的各类营养物质^[1-2]。然而, 这类食品在储藏和运输环节中极易受到微生物的污染, 特别是对于免疫力相对较弱的婴幼儿、老年人及孕妇等群体, 其健康安全问题更是面临着严峻的威胁^[3-4]。在 2022 年, 美国发生 4 起婴儿因食用乳粉而感染致病菌的事件, 其中 3 起由克罗诺杆菌(原称为阪崎肠杆菌)引起, 另外 1 起由沙门氏菌导致, 该事件导致 1 名婴儿不幸丧生。因此, 确保配方乳粉安全对于保护婴幼儿健康至关重要。

配方乳粉中的高风险致病菌主要包括大肠埃希氏菌、沙门氏菌、克罗诺杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和单核增生李斯特氏菌等^[5-8]。这些致病菌中, 前 4 种是我国食品安全监督抽检在配方乳粉致病菌检测中的必检项目。大肠埃希氏菌作为引起细菌性疾病的主要病原体之一, 其致病性在全球范围内位列前列。根据我国食品安全抽检数据, 大肠菌落总数已成为乳品监督抽检中不合格项目的主要微生物指标。其中, 大肠埃希氏菌 O157:H7 的致病性显著高于一般大肠埃希氏菌, 仅需 100-200 个活菌即可突破胃酸屏障, 进而引发感染。一旦感染, 患者可能会发展为溶血性尿毒综合征、血栓性血小板减少性紫癜等严重并发症, 甚至危及生命^[9-11]。金黄色葡萄球菌引起的细菌性疾病在致病性方面仅次于大肠埃希氏菌, 位居第二, 能够导致败血症、肺炎等疾病^[12]。克罗诺杆菌对婴幼儿的危害尤为严重, 可引发机体坏死性小肠结肠炎、脑膜炎和败血症, 其致死率高达 40%-80%^[13-14]。沙门氏菌在食品中引起的中毒

事件占比高达 80%, 感染后患者可能患上菌血症和脑膜炎, 对机体健康造成严重威胁^[15-16]。单核增生李斯特氏菌同样是一种重要的致病菌, 孕妇感染后可能导致胎儿感染、胎停育、流产等严重后果^[17-18]。蜡样芽孢杆菌因其能够产生芽孢和生物膜, 而具备了高度的抗性, 从而增加了彻底杀灭的难度。据世界卫生组织报道, 全球约有 1/10 的消费者因食用腐败食物而中毒, 其中蜡样芽孢杆菌引起的感染事件位列第三^[19-20]。因此, 加强配方乳粉中致病菌的检测工作尤为重要^[21-22]。

传统的食源性致病菌检测通常结合微生物培养法和生化分析 2 种方法, 我国现行国标 GB/T 4789 系列标准也主要采用这 2 种方法进行测定。尽管传统的微生物检测方法在准确性方面表现良好, 但检验流程繁琐、耗费时间较长、灵敏度相对较低等问题, 极大限制了检测的时效性^[23]。相比之下, PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、显著优点, 是替代传统培养法的有力候选, 也是目前应用最广泛的快速检测技术。然而, PCR 技术仍需大约 2 h 来完成对目的基因的扩增, 并且需要配备专业的变温核酸扩增仪器^[24]。酶促等温扩增 (enzymatic recombinase amplification, ERA) 技术是我国于 2019 年自主研发的一项技术。其基本原理是重组酶首先与上、下游引物结合, 寻找并定位同源双链 DNA。一旦定位成功并发生链交换, 同时单链结合蛋白 (single-stranded DNA-binding protein, SSB) 与亲本链绑定, 阻止其与已脱离的模板链再次发生相互作用。随后, DNA 聚合酶从上、下游引物的 3' 端启动合成, 形成 2 条新的双链 DNA, 如此循环往复, 实现扩增。该技术具有反应温度低、

反应速率快、灵敏度高等特点。在 25–42 °C 条件下仅需 10–30 min 即可达到与 PCR 技术相当的扩增效率，且无需热循环设备。这一特性解决了传统 PCR 依赖精密仪器、需要变温条件、检测周期较长等问题，展现出优秀的快速检测应用前景^[25]。目前，ERA 技术已在临床和检疫领域得到相关研究。例如，Li 等^[26]采用 ERA 方法快速检测了虾肠细胞虫感染；曾宇晨等^[27]建立了非洲猪瘟 ERA 快速检测方法；刘迪等^[28]开发了 ERA-LFD 猫疱疹病毒现场快速检测方法；Deng 等^[29]则建立了 ERA-CRISPR/Cas12a 肺炎支原体的快速检测方法。这些研究中，临床样本的检测结果与实时荧光 PCR 法检测结果一致，充分证实了 ERA 方法的准确性。然而，目前的研究大多聚焦于单个靶标的检测。针对配方乳粉中易污染的克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌这 6 种菌，本研究建立了双重 ERA 快速检测方法。相较于单重 ERA，该方法提高了反应通量，进一步缩短了检测时间。本研究为食源性致病菌的快速筛查提供了新的、有效的检测手段。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验用菌分别来源于美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)、德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DSM)、英国典型菌种保藏中心 (National Collection of Type Cultures, NCTC)、比利时细菌菌种保藏中心 (Bacteria Collection, LMG)、中国医学细菌菌种保藏管理中心 (National Center for Medical Culture Collections, CMCC) 和中国检验检疫微生物菌种保藏管理中

心 (Inspection and Quarantine Culture Collections, IQCC)，以上所有菌均保藏于 IQCC。信息详见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

脑心浸液肉汤培养基 (brain heart infusion, BHI)、脑心浸液琼脂培养基 (brain heart infusion Agar, BHIA)、LB 肉汤培养基，Oxoid 公司；PrepMan™ Ultra 样品制备试剂，ThermoFisher Scientific 公司；荧光型核酸扩增试剂盒 (ERA 法)，苏州先达基因科技有限公司；市售配方乳粉样品购自北京超市和电商。

便携式实时荧光 PCR 仪，艾济遗传 (北京) 科技有限公司；离心机，ThermoFisher Scientific 公司；掌上离心机，Scilogex 公司；紫外可见光分光光度仪，岛津公司；涡旋混合器，IKA 公司；高压灭菌锅，Tuttnauer 公司；电热恒温培养箱，Mettler 公司。

1.2 菌株的分离培养和 DNA 提取

蘸取菌液在 BHIA 培养基表面划线，于 37 °C 培养 18 h 后，挑取单菌落加入到 5 mL 的 BHI 培养基中，继续培养 12 h。取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中 16 000×g 离心 2 min，弃去上清后加入 100 μL PrepMan™ Ultra 进行 DNA 提取，涡旋振荡混匀，100 °C 加热 5 min 后 16 000×g 离心 2 min，取 50 μL 上清液即为 DNA 模板，测其浓度后于 -20 °C 保存。

1.3 引物探针的筛选

从 GenBank 数据库中提取阪崎克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) ATCC 29544、莫氏克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter mytjensii*) ATCC 51329、丙二酸克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter malonicus*) DSM 18702、都柏林克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter dublinensis*) DSM 18705、广泛克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter universalis*) NCTC 9529、苏黎士克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter turicensis*)

表1 本研究所用菌株信息

Table 1 The information of strains used in this study

Strains number	Genus name	Bacterial strains	Source
1	<i>Cronobacter</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544
2		<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329
3		<i>Cronobacter malonaticus</i>	DSM 18702
4		<i>Cronobacter dublinensis</i>	DSM 18705
5		<i>Cronobacter universalis</i>	NCTC 9529
6		<i>Cronobacter turicensis</i>	DSM 18703
7		<i>Cronobacter condimenti</i>	LMG 26250
8		<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i>	DSM 18707
9		<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lausannensis</i>	LMG 23824
10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43895
11		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	NCTC 12900
12		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43889
13		<i>Escherichia coli</i> H11:O130	IQCC 50170
14		<i>Escherichia coli</i> H7:O28ac	IQCC 30146
15		<i>Escherichia coli</i> H11:O78	IQCC 30120
16		<i>Escherichia coli</i>	IQCC 10198
17		<i>Escherichia coli</i>	CMCC 44104
18		<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775
19		<i>Escherichia hermannii</i>	IQCC 10117
20	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
21		<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 63303
22		<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
23		<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019
24	Others	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932
25		<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 43971
26		<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600
27		<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729
28		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33847
29		<i>Streptococcus hemolyticus</i> -β	CMCC 32210
30		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	IQCC 12312
31		<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119
32		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25619
33		<i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51571
34		<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	ATCC 17397

DSM 18703、香料克洛诺斯杆菌(*Cronobacter condimenti*) LMG 26250、都柏林克洛诺斯杆菌奶粉亚种(*Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*) DSM 18707 和都柏林克洛诺斯杆菌洛桑亚种

(*Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis*) LMG 23824, 以及其他近源食源性致病菌的外膜蛋白 X (outer membrane protein X, OmpX) 基因序列, 利用 ClustalX 软件进行多重序列比对,

在属间保守区域和属间差异性区域设计克罗诺杆菌 ERA 引物探针。经过多组引物探针筛选,已经确定了可用于 ERA 检测体系的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单核增生李斯特氏菌引物探针^[30-31]。本研究进一步对文献[32-38]中的大肠埃希氏菌 O157:H7 (根据靶标基因分别命名为 rfbE1-F/R/P、rfbE2-F/R/P、rfbE3-F/R/P、VP4-F/R/P、flic-F/R/P、STX-F/R/P)和蜡样芽孢杆菌的 RPA 引物探针进行 ERA 实验效果分析,确定最优引物探针组合。

在引物探针筛选过程中,探针的荧光基团统一为 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, FAM),淬灭基团统一用黑洞猝灭剂-1 (black hole quencher, BHQ1)。在进行双重 ERA 法检测时,金黄色葡萄球菌探针的荧光基团换为罗丹明 X (X-rhodamine, ROX),淬灭基团不变;大肠埃希氏菌 O157:H7 和单核增生李斯特氏菌探针的荧光基团换为花青素 5 (cyanine 5, Cy5),淬灭基团换为黑洞猝灭剂-2 (black hole quencher, BHQ2)。引物探针序列和标记信息详见表 2,引物探针由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.4 引物探针特异性分析

分别以克罗诺杆菌 ATCC 29544、大肠埃希氏菌 O157:H7 ATCC 43895、蜡样芽孢杆菌 ATCC 10876 为靶标菌株,并互为对照菌株,同时以表 1 中编号 24-34 的 11 株菌为阴性对照菌株,进行 ERA 特异性分析。所有样品的基因组 DNA 浓度统一为 10 ng/ μL ,重复实验 3 次。

1.5 单重 ERA 检测

反应预混液参照荧光型核酸扩增试剂盒 (ERA 法)使用说明书制备:溶解剂 20.0 μL ,正、反向引物 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)各 2.1 μL ,探针 0.6 μL ,模板 1.0 μL , ddH₂O 22.2 μL 。取上述 48.0 μL 预混液溶解酶粉,振荡混匀并短暂离心。在管盖

上加入 2.0 μL 的激活剂,小心盖好管盖,瞬时离心使激活剂进入预混液中,短暂振荡混匀并再次快速离心,放入便携式实时荧光 PCR 仪中反应。反应程序:第一阶段 39 $^{\circ}\text{C}$ 1 s;第二阶段 39 $^{\circ}\text{C}$ 16 s,共 60 个循环,进行 FAM 荧光信号收集,以无菌 ddH₂O 为空白对照,重复实验 3 次。

1.6 双重 ERA 反应体系及检测程序

双重 ERA 反应体系参照荧光型核酸扩增试剂盒 (ERA 法)使用说明书制备预混液,每种上、下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1.0 μL ,每种探针 0.4 μL ,取混匀后的预混液 46.0 μL 至 ERA 酶粉反应管,模板量均为 2.0 μL ,向管盖滴加 2.0 μL 激活剂,盖紧后涡旋瞬时离心,放入便携式实时荧光 PCR 仪进行 ERA 反应。反应程序为第一阶段 39 $^{\circ}\text{C}$ 1 s;第二阶段 39 $^{\circ}\text{C}$ 14 s,共 40 个循环,进行 FAM 荧光信号收集,以无菌 ddH₂O 为空白对照,重复实验 3 次。

1.7 双重 ERA 检测方法反应体系的优化

1.7.1 引物体积优化

将反应体系中 3 种致病菌的正、反向混合引物的体积分别调整至 0.5、1.0、1.5、2.0 μL ,保持其他组分不变,并相应调整 ddH₂O 含量,使反应体系总体积保持不变,放入便携式实时荧光 PCR 仪中反应,每个反应设置 2 个平行,并重复实验 3 次。

1.7.2 探针体积优化

采用 1.7.1 筛选出的扩增效率最好的引物体积,将体系中的探针体积分别调整至 0.2、0.4、0.6、0.8 μL ,其他组分保持不变,余下步骤同 1.7.1。

1.7.3 激活剂体积优化

采用 1.7.1 和 1.7.2 筛选出扩增效率最好的引物及探针体积,将体系中的 Mg²⁺激活剂体积

表2 引物和探针序列信息

Table 2 The information of primers and probes

Target bacteria	Sample number	Primers name	Primer sequences (5'→3')	GenBank accession number	Target genes	Location
<i>Cronobacter</i>	1#	K-F	CCTACACCGAAAAAGATCGCACCGAAGAT	CP027107.2	<i>ompX</i>	1 989 256–1 989 284
		K-R	GAGAAAGTCCAGAGCAACGTCCTGAACC			1 989 044–1 989 070
		K-P	CGACTGGGCGGAGCACTACGGCGTAGTGGG[FAM-dT][THF] [BHQ1-dT]TGGTTACGACAAAAGCT[c3-spacer]			
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	2#	rfbE2-F	AAAGGTAATAATGTGGGAA CATTGGGAGAT	AF163334.1	<i>rfbE</i>	12–41
		rfbE2-R	AAAATCATCAGCTTGTCTAACTGGGCTAA			234–263
		rfbE2-P ^a	TGGAATGGTTGTCACGAATGACAAAACAC[Cy5-dT][THF]A [BHQ2-dT]GACCGTTGTTAC[c3-spacer]			
<i>Bacillus cereus</i>	3#	L-F	ATACCCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAG	KY22497	16S rRNA	777–811
		L-R	CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCA	0.1		1 048–1 083
		L-P	CTAAGTGTTAGAGGGTTTCGGCCCTTAGTGC[FAM-dT][THF] AAG[BHQ1-dT]AAACGCAITAAAGC[c3-spacer]			
<i>Staphylococcus aureus</i>	4#	J-F	CTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCG	0R726991.1	<i>nuc</i>	22–51
		J-R	TCTAITTA CGCCATTATCTGTTTGTGATGC			145–174
		J-P ^a	ACGCAAAGAGGTTTTCTATTTCCGTAC[ROX-dT]A[THF] [BHQ1-dT]TGGTTAGTGTAAAC[c3-spacer]			
<i>Salmonella</i>	5#	S-F	ATATTACCAGATATATATTAGAGCAATGGAAA	CP043222.1	<i>fimY</i>	28 653–28 685
		S-R	ATAGCCGAGGTAGTTATCAGTTGTAATTATTG			28 849–28 879
		S-P	TTTAAAGAAATGCCAAAGACTGGCCTGCCG[FAM-dT][THF] [BHQ1-dT]CACTCTCCAACGCCG[c3-spacer]			
<i>Listeria monocytogenes</i>	6#	D-F	TCGATCACTCTGGAGGATACTGCTCAATTC	LC259949.1	<i>hlyA</i>	1 473–1 504
		D-R	GTTACCAGGCAAAATAGATGGACGATGTGAAAT			1 599–1 630
		D-P ^a	CATTTCTGGGATGAAAGTAAATTAATGATCC [Cy5-dT]GA[THF]GG[BHQ2-dT]AACGAAATGTTTC[c3-spacer]			

^a indicates that the fluorescens of the probe are uniformly modified by FAM in the primers screening process, and the quenched group is BHQ1. The fluorescens of the probe in the dual ERA detection process are listed in the table, where the quenched group is replaced by BHQ2 when Cy5 is the fluorescence group.

分别调整至 1.0、2.0、3.0、4.0 μL ，其他组分保持不变，余下步骤 1.7.1。

1.8 双重 ERA 检测方法反应程序的优化

为满足快速检测需求，在 1.7 的最佳反应体系的基础上对反应程序进行优化，即反应程序第二阶段控制在 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，扩增程序分别调整为 14 s、50 循环；14 s、40 循环；10 s、40 循环；10 s、30 循环，分别放入便携式实时荧光 PCR 仪中反应，在第二反应阶段收集 FAM/ROX/Cy5 荧光信号，同时以无菌 ddH₂O 为空白对照，根据荧光扩增曲线结果确定最短反应时间，每个反应设置 2 个平行，并重复实验 3 次。

1.9 双重 ERA 检测方法灵敏度检测

为进一步分析建立的双重 ERA 检测方法的灵敏度，将模板 DNA 浓度分别稀释为 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ng/ μL ，采用已确定的双重 ERA 反应体系和反应程序进行实验，分析双重 ERA 检测的灵敏度。实验过程中以无菌 ddH₂O 为空白对照，每次实验 2 个平行，重复实验 3 次。

1.10 人工模拟污染试验

取单菌落加入至 10 mL 离心管中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 使细菌生长达到稳定期 (OD_{600} 值约为 2.8)，作为后续实验用的种子液。将种子液以 1% 接种量接入 BHI 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h，梯度稀释后通过平板计数法对生长量进行测算，确定 6 种细菌在这一培养条件下的生长量。按上述操作重新培养菌液 12 h，根据生长量计算，使用无菌水稀释至 100 CFU/mL。

称取 25 g 婴儿配方乳粉作为基质，加入 250 mL BHI 培养基制成均质液。向均质液中分别添加 2.5 mL 上述 100 CFU/mL 的克罗诺杆菌 ATCC 29544 和大肠埃希氏菌 O157:H7 ATCC

43895、蜡样芽孢杆菌 ATCC 10876 和金黄色葡萄球菌 ATCC 12600、沙门氏菌 ATCC 43971 和单核增生李斯特氏菌 ATCC 13932 混合菌液，即每种菌的污染量为 1 CFU/mL，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 0、2、4、6、8 h 后，按 1.2 方法提取基因组 DNA。分析人工污染样品的检出限。实验过程中以无菌 ddH₂O 为空白对照，重复实验 3 次。

1.11 市售样品检测

对 37 份临近保质期的婴儿配方乳粉，按 1.10 方法取样均质后 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h，采用 1.2 的方法提取基因组 DNA。分别以中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1870—2016 《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》^[39] 规定的大肠埃希氏菌、沙门氏菌、克罗诺杆菌、金黄色葡萄球菌和单核增生李斯特氏菌实时荧光 PCR 法，SN/T 3932—2014 《出口食品中蜡样芽孢杆菌快速检测方法 实时荧光定量 PCR 法》^[40] 规定的蜡样芽孢杆菌实时荧光定量 PCR 法，以及本研究建立的双重 ERA 法进行检测，分析建立的双重 ERA 法的实际检测效果和准确性。实验过程中以无菌 ddH₂O 为空白对照，重复实验 3 次。

2 结果与分析

2.1 ERA 检测引物探针筛选

2.1.1 引物探针筛选

本研究设计了 4 组克罗诺杆菌引物探针，经过筛选发现引物探针组合 K-F/R/P 对 7 种克罗诺杆菌，包括阪崎克罗诺杆菌、莫金斯科罗诺杆菌、丙二酸盐阳性克罗诺杆菌、尤尼沃斯科罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌、康帝蒙提克罗诺杆菌、都柏林克罗诺杆菌，以及都柏林克罗诺杆菌的 2 个亚种：克罗诺杆菌乳粉亚种和都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种的扩增效果均较好（图 1A），说明可以较好地覆盖克罗诺杆菌属，

因此以其作为克罗诺杆菌的 ERA 检测的引物探针。另外, 分析发现重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 和 ERA 在原理上有一定的相似性^[25], 前期经过多组引物探针筛选, 确定了可用于 ERA 检测体系的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单核增生李斯特氏菌引物探针^[30-31]。本研究进一步经过筛选,

对文献[32-38]中 6 组大肠埃希氏菌 O157:H7 和 1 组蜡样芽孢杆菌的 RPA 引物探针进行 ERA 检测效果分析。结果显示, rfbE2-F/R/P 引物探针组合对 3 株大肠埃希氏菌 O157:H7 的扩增效率均较好(图 1C), 且对其他大肠埃希氏菌无扩增, 说明该引物探针组合适用于 ERA 检测体系, 其他 5 组 RPA 引物探针或在 ERA 检测体系对个别

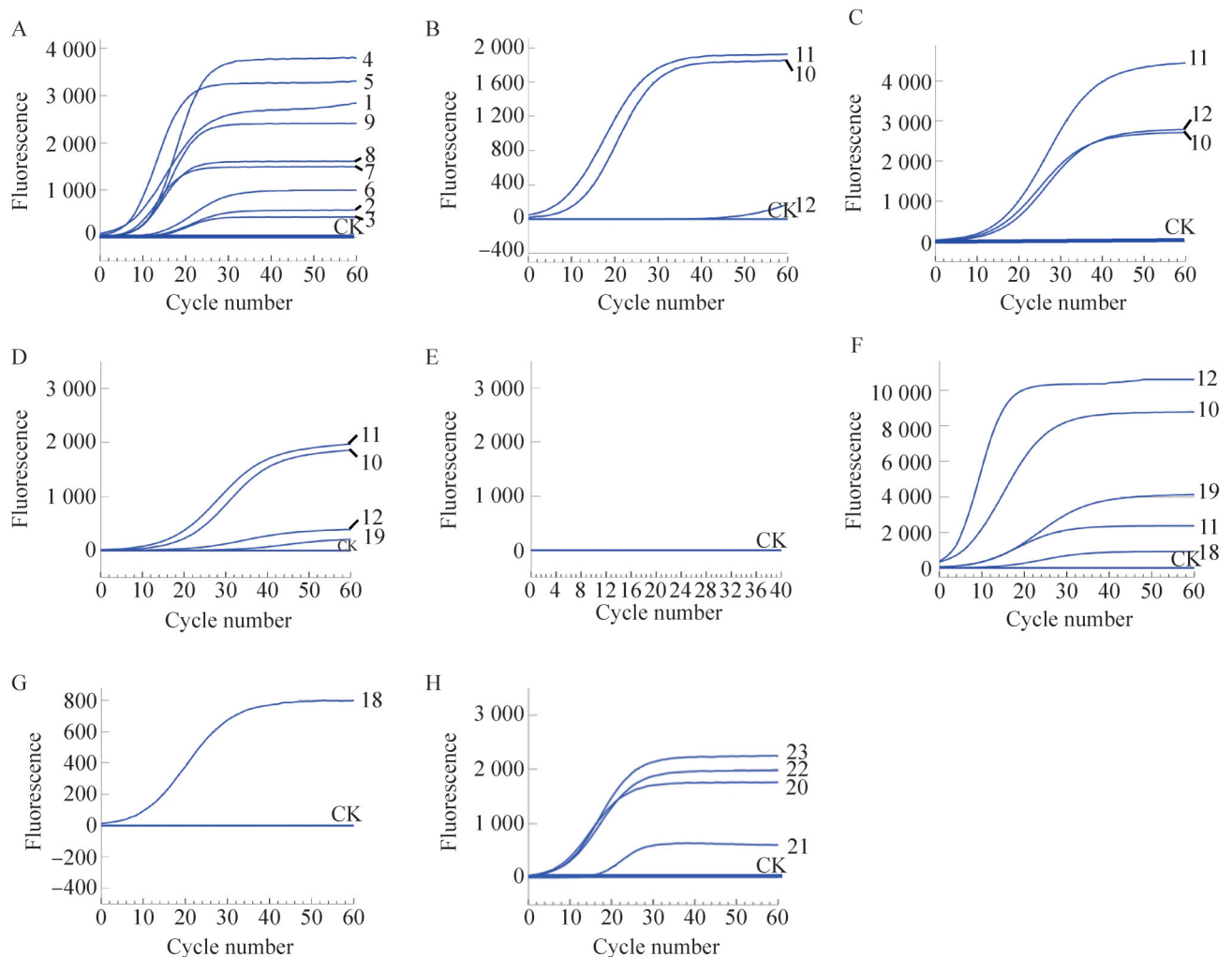


图1 引物和探针的筛选结果

Figure 1 The screening results of primers and probes. A: Amplification results of designed the primers and probe of K-F/R/P for *Cronobacter*; B-G: Amplification results of six groups of primers and probes for *E. coli*: rfbE2-F/R/P, rfbE1-F/R/P, rfbE3-F/R/P, flic-F/R/P, STX-F/R/P, VP4-F/R/P in ERA detection system; H: Amplification results of the primers and probe of L-F/R/P for *B. cereus* in ERA detection system. The strain names and strain numbers corresponding to 1-23 are shown in Table 1. CK represents blank control.

大肠埃希氏菌 O157:H7 的扩增效率差(图 1B), 或能检出其他大肠埃希氏菌(图 1D、1F、1G), 或无扩增(图 1E), 说明其不适用于 ERA 检测体系。L-F/R/P 引物探针对 4 株蜡样芽孢杆菌扩增效果均较好(图 1H), 说明该引物探针组合也适用于 ERA 检测体系。因此选用 K-F/R/P、rfbE2-F/R/P 和 L-F/R/P 分别作为克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7 和蜡样芽孢杆菌 ERA 检测的引物探针。

2.1.2 引物探针特异性分析

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单核增生李斯特氏菌引物探针已经过 ERA 试验特异性筛选^[30-31]。因此, 本研究仅对设计的克罗诺杆菌以及上述筛选的大肠埃希氏菌 O157:H7 和蜡样芽孢杆菌引物探针进行特异性分析。结果如图 2 所示, K-F/R/P 只能扩增代表菌株阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544, 其他非克罗诺杆菌均未能扩增; O157:H7 rfbE2-F/R/P 只能扩增代表菌株大肠埃希氏菌 O157:H7 ATCC 43895, 对其他大肠埃希氏菌和非大肠埃希氏菌均未能扩增; L-F/R/P 只能扩增出代表菌株蜡样芽孢杆菌 ATCC 10876, 对其他非蜡样芽孢杆菌均未能扩增, 说

明筛选的这 3 组引物探针特异性良好。

2.2 双重 ERA 检测体系的确定

对筛选出的 6 种目标菌株的特异性引物探针进行两两组合, 共构建 15 种不同的引物探针组合体系, 采用双重 ERA 检测进行体系分析, 结果如图 3 所示。当克罗诺杆菌与金黄色葡萄球菌(图 3A)或与沙门氏菌(图 3B)组合时, 存在交叉反应, 只能检出一种菌; 与大肠埃希氏菌 O157:H7 或单核增生李斯特氏菌组合的扩增效果较好(结果未呈现)。当蜡样芽孢杆菌与大肠埃希氏菌 O157:H7 (图 3C)虽然能同时检出 2 种菌, 但二者的荧光值较低; 当蜡样芽孢杆菌与单核增生李斯特氏菌(图 3D)组合时, 单核增生李斯特氏菌的荧光值较低。蜡样芽孢杆菌与沙门氏菌组合二者均未能扩增(图 3E)。金黄色葡萄球菌仅与蜡样芽孢杆菌或沙门氏菌组合时能扩增, 与其他组合均不能扩增(结果未呈现)。综合双重 ERA 组合扩增结果, 最终确定克罗诺杆菌与大肠埃希氏菌 O157:H7 (图 3F)、蜡样芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌(图 3G)、沙门氏菌与单核增生李斯特氏菌(图 3H)这种组合方式能够同时保证 6 种菌的扩增效果均较好, 无交叉反应, 因此以

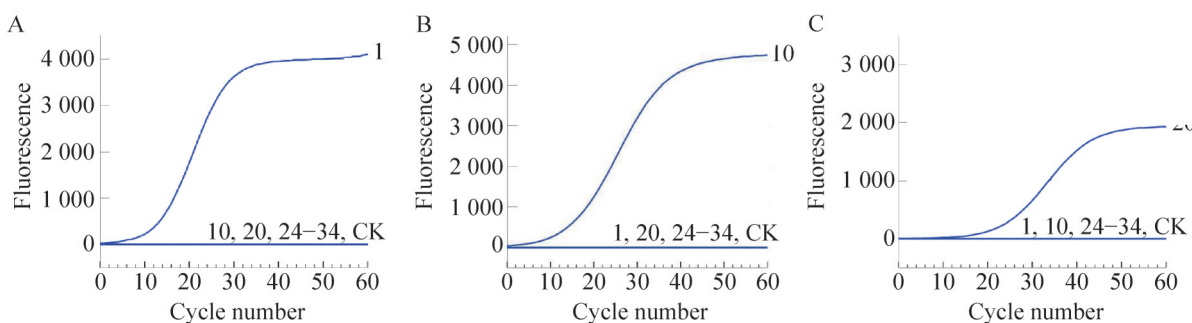


图2 筛选的引物探针ERA检测特异性分析

Figure 2 Specificity analysis of ERA detection with the screened primers and probes. A: Specificity analysis results of the primers and probe of K-F/R/P for *Cronobacter*; B: Specific analysis results of the primers and probe of rfbE2-F/R/P for *E. coli* O157:H7; C: Specificity analysis results of the primers and probe of L-F/R/P for *B. cereus*. The strain names and strain numbers corresponding to 1, 10, 20, 24-34 are shown in Table 1. CK represents blank control.

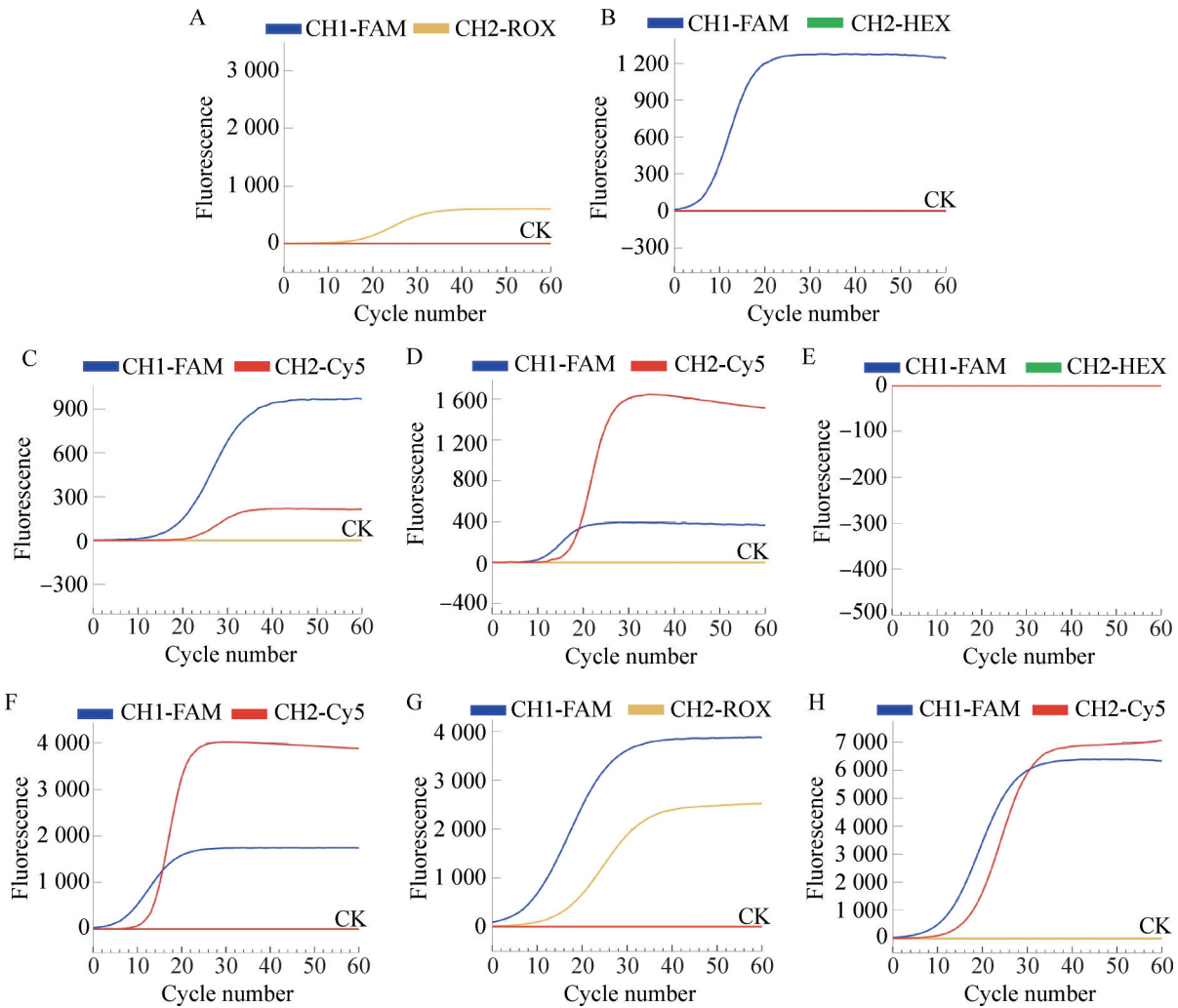


图3 六种菌的双重ERA检测结果

Figure 3 Detection results of dual ERA for six bacteria. A: Dual ERA detection results of *Cronobacter* (FAM) and *S. aureus* (ROX); B: Dual ERA detection results of *Cronobacter* (FAM) and *Salmonella* (HEX); C: Dual ERA detection results of *B. cereus* (FAM) and *E. coli* O157:H7 (Cy5); D: Dual ERA detection results of *B. cereus* (FAM) and *L. monocytogenes* (Cy5); E: Dual ERA detection results of *B. cereus* (FAM) and *Salmonella* (HEX); F: Dual ERA detection results of *Cronobacter* (FAM) and *E. coli* O157:H7 (Cy5); G: Dual ERA detection results of *B. cereus* (FAM) and *S. aureus* (ROX); H: Dual ERA detection results of *Salmonella* (FAM) and *L. monocytogenes* (Cy5). CK represents blank control.

这种组合方式作为 6 种菌的双重 ERA 检测体系。

2.3 双重 ERA 反应体系优化

为提高扩增效率, 进一步对上述建立的双重 ERA 反应体系进行优化, 结果如图 4 所示,

在克罗诺杆菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 双重 ERA 反应体系中, 每种菌上、下游引物的最佳用量为 1.5 μL (图 4A), 每种菌探针的最佳用量为 0.4 μL (图 4B); 蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌双重 ERA 反应体系中每种菌上、下游引物

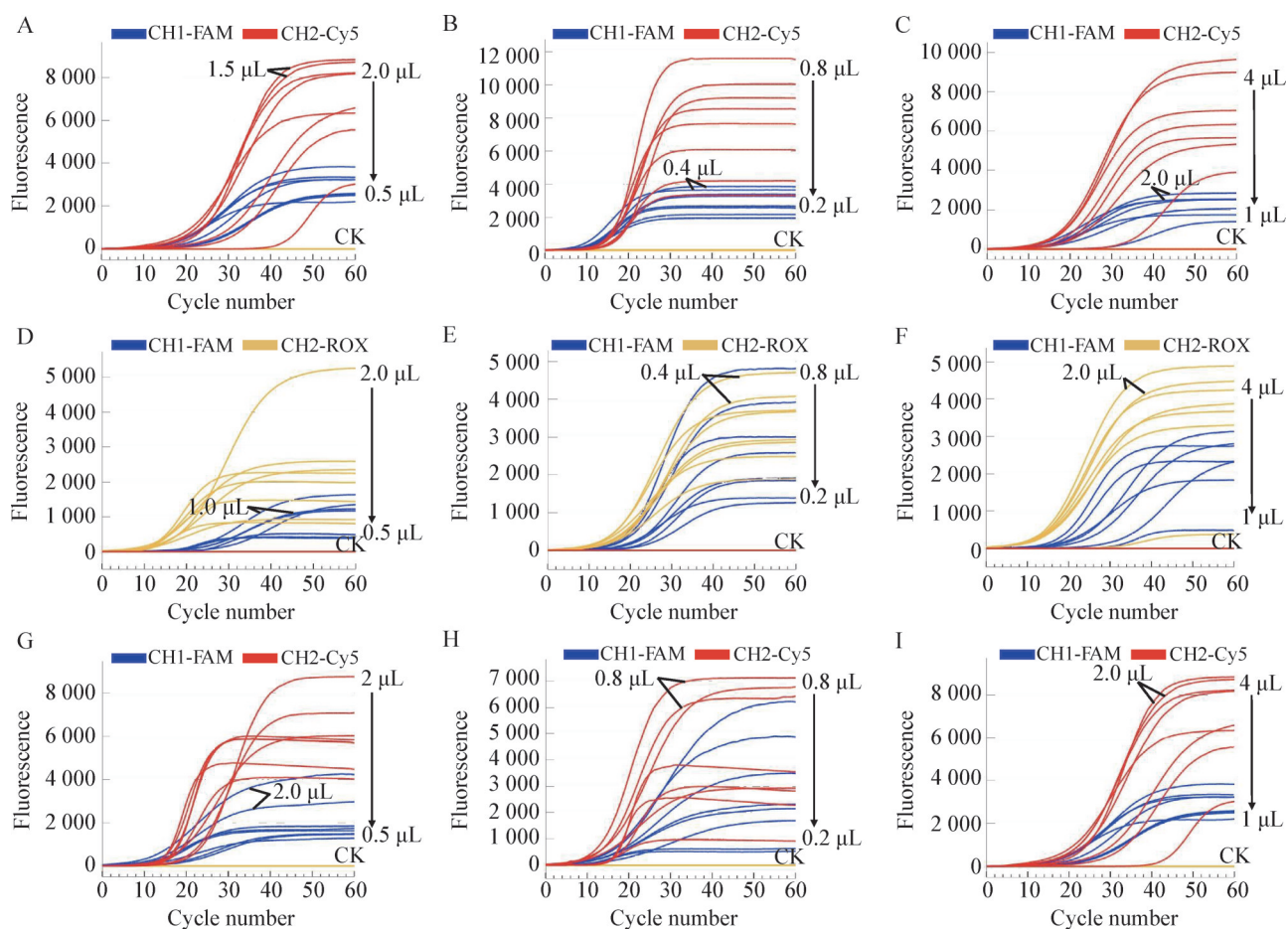


图4 双重ERA体系优化结果

Figure 4 Optimization results of dual ERA system. A–C: Dual ERA amplification results of *Cronobacter* (FAM) and *E. coli* 0157:H7 (Cy5) with optimized amounts of primers, probes and activators; D–F: Dual ERA amplification results of *B. cereus* (FAM) and *S. aureus* (ROX) with optimized amounts of primers, probes and activators; G–I: Dual ERA amplification results of *Salmonella* (FAM) and *L. monocytogenes* (Cy5) with optimized amounts of primers, probes and activators. CK represents blank control.

的最佳用量为 1 μL (图 4D)、每种菌探针的最佳用量为 0.4 μL (图 4E); 在肠沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌双重 ERA 反应体系中, 每种菌上、下游引物的最佳用量为 2 μL (图 4G)、每种菌探针的最佳用量为 0.8 μL (图 4H); 3 组双重 ERA 反应体系中, 激活剂的最佳用量均是 2 μL (图 4C、4F、4I)。

2.4 双重 ERA 检测程序优化

为建立双重 ERA 快速检测程序, 对原始反

应程序进行优化, 结果如图 5 所示, 对应的检测时间分别为 28 min 10 s (图 5A、5E、5I)、27 min 30 s (图 5B、5F、5J)、16 min 10 s (图 5C、5G、5K)、15 min 10 s (图 5D、5H、5L), 结果显示, 当检测程序缩短到 15 min 10 s 时, 蜡样芽孢杆菌与金黄色葡萄球菌双重 ERA 体系对蜡样芽孢杆菌检测的重复性差(图 5H), 沙门氏菌与单核增生李斯特氏菌双重 ERA 体系对两种菌检测的两个平行重复只能检出 1 次

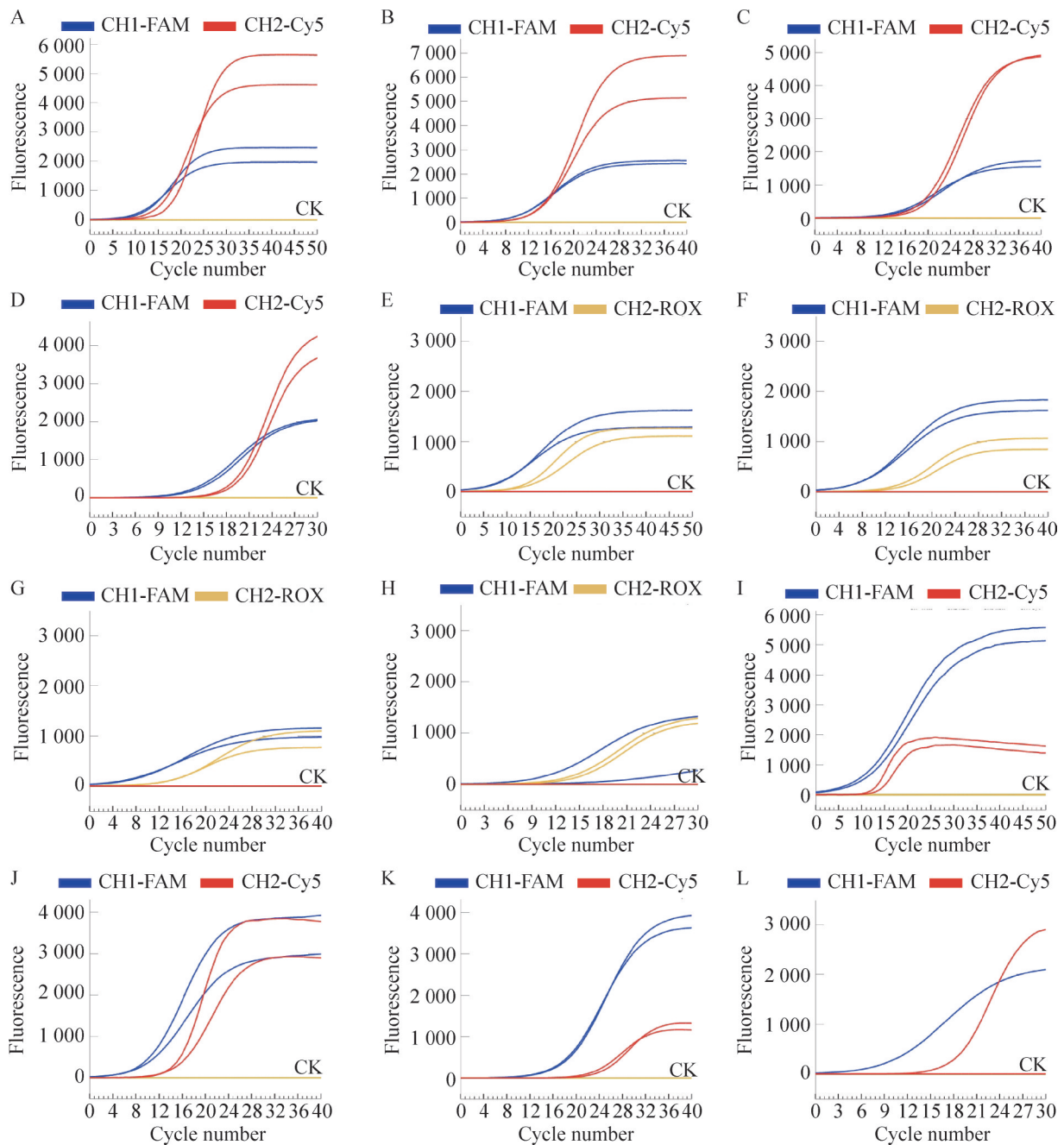


图5 双重ERA程序优化结果

Figure 5 Optimization results of the dual ERA program. A–D: The detection results of dual ERA for *Cronobacter* (FAM) and *E. coli* O157:H7 (Cy5) in the second amplification procedure with 14 s, 50 cycles, 14 s, 40 cycles, 10 s, 40 cycles, and 10 s, 30 cycles; E–H: The detection results of dual ERA for *B. cereus* (FAM) and *S. aureus* (ROX) in the second amplification procedure with 14 s, 50 cycles, 14 s, 40 cycles, 10 s, 40 cycles, and 10 s, 30 cycles; I–L: The detection results of dual ERA for *Salmonella* (FAM) and *L. monocytogenes* (Cy5) in the second amplification procedure with 14 s, 50 cycles, 14 s, 40 cycles, 10 s, 40 cycles, and 10 s, 30 cycles. CK represents blank control.

(图 5L), 说明该程序不再适合进行 6 种菌双重 ERA 检测的程序。当检测程序缩短到 16 min 10 s 时, 双重 ERA 检测对 6 种菌均具有良好的扩增效率, 可以满足检测需求, 因此确定同时满足 6 种菌双重 ERA 的最短反应时间为 16 min 10 s (39 °C 1 s; 39 °C 10 s, 40 个循环), 相较于原始反应程序的 32 min 10 s (39 °C 1 s; 39 °C 14 s, 60 个循环), 可以节省 16 min。

2.5 双重 ERA 检测灵敏度

为分析建立的双重 ERA 快速检测程序的灵敏度, 对模板 DNA 浓度梯度稀释, 检测结果详见图 6, 克罗诺杆菌和大肠埃希氏菌 O157:H7 (图 6A)、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌 (图 6B) 2 种双重 ERA 快速检测方法对 DNA 检

测的灵敏度均为 1 ng/μL; 沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌(图 6C)对 DNA 的检测灵敏度为 10⁻¹ ng/μL, 方法灵敏度较好。

2.6 人工污染试验

使用本研究建立的双重 ERA 快速检测方法对人工污染的配方乳粉样品进行检测, 结果详见表 3, 人工模拟污染的配方乳粉样品可在前增菌 6 h 后在一个反应同时检出终浓度为 1 CFU/mL 的 2 种致病菌, 检出限可以满足检测需求。

2.7 市售样品检测

分别采用 SN/T 1870—2016 和 SN/T 3932—2014 的实时荧光 PCR 法和本研究建立的双重 ERA 快速检测方法对 37 份临近保质期的市售配方乳粉样品进行检测, 37 份样品中有 14 份检出

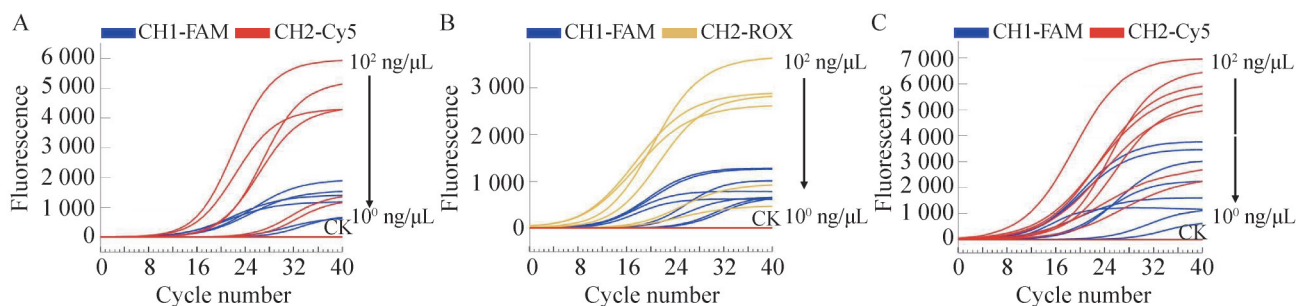


图6 双重ERA灵敏度分析

Figure 6 Sensitivity analysis of dual ERA. A: The sensitivity analysis results of the dual ERA detection procedure for *Cronobacter* (FAM) and *E. coli* O157:H7 (Cy5); B: The sensitivity analysis results of the dual ERA detection for *B. cereus* (FAM) and *S. aureus* (ROX); C: The sensitivity analysis results of the dual ERA detection for *Salmonella* (FAM) and *L. monocytogenes* (Cy5). CK represents the blank control.

表3 人工污染检测结果

Table 3 The detection results of artificially contaminated samples

Time (h)	<i>Cronobacter</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
0	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+

+: Positive; -: Negative.

蜡样芽孢杆菌, 检出率为 37.84%; 有 8 份检出单核增生李斯特氏菌, 检出率为 21.62%。本研究检测结果与实时荧光 PCR 的检测结果一致, 证明建立的双重 ERA 快速检测方法扩增 15 min 与实时荧光 PCR 扩增约 90 min 的结果等效, 可实现乳粉中 6 种致病菌的多重快速检测。

3 讨论与结论

为了提高 ERA 反应通量和检测效率, 本研究针对配方乳粉中 6 种易污染的食源性致病菌建立了双重 ERA 检测方法, 并总结了建立多重检测方法的关键点。

3.1 引物探针筛选

双重 ERA 技术需在同一反应体系中加入 2 对引物探针, 这些引物探针需要分别结合在模板 DNA 的特定区域, 并确保能同时扩增出 2 个靶标核酸片段。因此, 引物探针必须经过严格的设计和实验筛选, 以确保其具有较高的特异性, 避免引物间的非特异性结合及引物二聚体的形成; 同时还需保证荧光值和出峰时间, 以确保后续双重反应的扩增效率。

3.2 交叉反应性

由于不同菌株间可能存在交叉反应, 在进行双重反应时, 需确保不同靶标在一个反应体系中的兼容性, 避免相互干扰和抑制, 本研究通过两两组合分析扩增效果, 确定了最优的双重组合。

3.3 反应体系优化

反应体系需包含适量的引物、探针、模板 DNA 和激活剂等组分。因此, 需通过实验对这些组分的浓度和比例进行优化, 以确保每个目标序列都能得到均衡的扩增。此外, 为提高扩增效率, 可在反应体系中添加适量的 DMSO 或甘油等辅助剂。因为 DMSO 能与 DNA 双链结合, 使其解旋, 增加扩增反应的特异性^[41]; 而

甘油作为低温保护剂, 能延长扩增试剂的稳定时间^[42]。

3.4 反应条件优化

反应体系的优化还包括温度条件、荧光采集时间和循环数的设置等。因 ERA 的最适反应温度一般为 37 °C, 本研究主要对反应时间和循环数进行了优化。过长的反应时间和过多的循环数可能导致非特异性扩增增加, 而过少则可能无法获得足够的扩增产物。通过以上四点优化, 可提高检测的灵敏度、重现性和准确性。

理论上, 建立三重、四重或更多重的检测方法能进一步提高检测通量, 但难度也会相应提升。一方面, 需要配备具有更多荧光通道的检测仪, 另一方面, 可能会降低扩增效率。这是因为反应体系中加入更多引物探针, 会增加引物间的非特异性结合和二聚体的形成; 多靶标在同一反应体系中的相互干扰和抑制也会增加; 扩增的偏好性还可能导致某些 DNA 片段或模板被优先扩增, 而其他片段的扩增较少或无扩增。本研究在建立双重 ERA 检测体系时发现, 克罗诺杆菌和大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌 2 种组合的灵敏度相较于沙门氏菌和单核增生李斯特氏菌组合低。这除了是自身引物探针的扩增效率存在差异外, 很有可能是因为检测体系中多个引物探针、多个靶标之间出现交叉抑制或扩增的偏好性所致。这一方面可通过增加前增菌时间以提高检出率, 另一方面, 也可进一步筛选更优的引物探针组合以提高检测的灵敏度, 减少在实际应用中的影响。

本研究通过引物探针筛选、特异性分析、双重组合的确定, 建立了配方乳粉中克罗诺杆菌-大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌-金黄色葡萄球菌、沙门氏菌-单核增生李斯特氏菌 3 组双重 ERA 检测方法。通过对反应体系、扩

增程序的优化, 将检测时间缩短到 20 min 左右。对克罗诺杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、蜡样芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌纯培养物的检出限为 1 ng/μL, 对沙门氏菌、单核增生李斯特氏菌纯培养物的检出限为 10⁻¹ ng/μL, 前增菌 6 h, 样品中致病菌检出限可达 1 CFU/mL。本研究建立的配方乳粉中食源性致病菌双重 ERA 方法, 通过不同的荧光信号同时检测多种靶点, 操作简单、时效性强、灵敏度高, 为有效预防食源性疾病的发生提供了一定的技术保障。

作者贡献声明

苗雅倩: 负责文章的撰写和修改工作, 完成双重 ERA 的具体实验和数据分析; 杨艳歌: 负责引物探针设计, 设计研究方案, 指导完成具体的研究内容和文章的修改; 赵健淞: 负责单重 ERA 引物探针筛选, 并参与实验的讨论和数据的收集与整理工作; 魏莹: 负责克罗诺杆菌引物探针的筛选, 为后续实验的顺利推进提供了数据支持; 王秀娟: 负责文章的检查和校对, 确保论文的准确性和专业性; 袁飞: 有效协调研究成员的工作, 确保各项研究任务的顺利推进和高效完成; 王正亮: 对本研究进行有效监督和指导, 同时负责论文的整体框架构建; 张峰: 明确研究目标和研究内容, 确保文章的逻辑性和条理性。该成果由张峰于 2025 年 1 月 1 日前指导完成。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 何婉, 樊斌. 疫情下我国乳制品消费的新趋势[J]. 乳品与人类, 2021(6): 42-47.
HE W, FAN B. New trend of dairy consumption in China under epidemic situation[J]. *Dairy and Human*, 2021(6):

- 42-47 (in Chinese).
- [2] 于博. 婴幼儿配方奶粉中常见致病菌的可视化快速检测与试剂盒的组装[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2022.
YU B. Visual rapid detection and kit assembly of common pathogenic bacteria in infant formula milk powder[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [3] 王明珠, 田子豪, 谭中美, 任洁, 武高云, 郭进琪, 姚玉昌, 尹园, 李柏良, 马佳歌, 于微. 细菌素协同物理技术对食源性致病菌和腐败微生物防控的研究进展[J/OL]. 食品工业科技, 2024. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030170>.
WANG MZ, TIAN ZH, TAN ZM, REN J, WU GY, GUO JQ, YAO YC, YIN Y, LI BL, MA JG, YU W. Research progress of bacteriocin combined with physical technology in the prevention and control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms[J/OL]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024030170> (in Chinese).
- [4] 周贯旭, 周群, 姜红, 徐雪芳. 基于化学计量学对食源性致病菌的红外光谱快速识别[J/OL]. 中国测试, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1714.tb.20240708.1654.002.html>.
ZHOU GX, ZHOU Q, JIANG H, XU XF. Rapid identification of foodborne pathogens using infrared spectroscopy based on chemometrics[J/OL]. *China Measurement & Test*, 2024. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1714.TB.20240708.1654.002.html> (in Chinese).
- [5] JANA M, ADRIANA V, EVA K. Evaluation of DNA extraction methods for culture-independent real-time PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* in cheese[J]. *Food Analytical Methods*, 2020, 13(3): 667-677.
- [6] 韩进兰. 食源性疾病监测中病原微生物检验结果分析[J]. 临床检验杂志(电子版), 2020, 9(1): 122.
HAN JL. Analysis of pathogenic microorganism test results in food-borne disease monitoring[J]. *Clinical Laboratory Journal (Electronic Edition)*, 2020, 9(1): 122 (in Chinese).
- [7] AKHTAR S, SARKER MR, HOSSAIN A. Microbiological food safety: a dilemma of developing societies[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(4): 348-359.
- [8] VALERO A, ORTIZ JC, FONGARO G, HERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ-LÁZARO D. Definition of sampling procedures for collective-eating establishments based on the distribution of environmental microbiological contamination on food handlers, utensils and surfaces[J]. *Food Control*, 2017, 77: 8-16.
- [9] 秦爱, 李根容, 邓方进, 张明娟, 周朝旭, 肖昭竞. 多重重组酶介导等温扩增技术检测食品中 3 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(5): 97-104.
QIN A, LI GR, DENG FJ, ZHANG MJ, ZHOU ZX, XIAO ZJ. Determination of three kinds of foodborne pathogens in food by multiplex recombinase aided amplification technology[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(5): 97-104 (in Chinese).
- [10] 陶梦珂, 李苗苗, 石晴晴, 赵恒, 张鲁星, 胡功政, 潘玉善,

- 刘建华. 鸡源大肠杆菌生物被膜形成与耐药性、毒力基因的关联性分析[J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(6): 86-93.
- TAO MK, LI MM, SHI QQ, ZHAO H, ZHANG LX, HU GZ, PAN YS, LIU JH. Association analysis between biofilm formation capacity of *Escherichia coli* derived from chickens and drug resistance and virulence genes[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 56(6): 86-93 (in Chinese).
- [11] 杨文仪, 肖家伟, 雷连成, 张付贤. 鸽源大肠杆菌 O157: 非 H7 菌株的致病性和耐药性分析[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(6): 169-182.
- YANG WY, XIAO JW, LEI LC, ZHANG FX. Pathogenicity and drug resistance isolation, identification and biological characteristics of pigeon derived *Escherichia coli* O157: non H7 strain[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(6): 169-182 (in Chinese).
- [12] 吴昆泽. 磁性生物炭/g-C₃N₄ 复合光催化剂对金黄色葡萄球菌的杀灭作用研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2024.
- WU KZ. Killing effect of magneticbiochar/g-C₃N₄ composite photocatalysts towards *Staphylococcus aureus*[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2024 (in Chinese).
- [13] 万志刚, 汤慕瑾, 吕敬章, 罗志军, 洪小柳, 马淑棉. 多种食源性致病菌检测的多重 PCR 方法的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(11): 2177-2181.
- WAN ZG, TANG MJ, LÜ JZ, LUO ZJ, HONG XL, MA SM. Study of a multiplex PCR method for the detection of foodborne pathogen[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(11): 2177-2181 (in Chinese).
- [14] 郭傲雪, 谷传奇, 文萱, 李新, 刘艳红. 克罗诺杆菌属检测方法研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2024, 45(10): 1251-1257.
- GUO AX, GU CQ, WEN X, LI X, LIU YH. Current development of detection of *Cronobacter* spp.[J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2024, 45(10): 1251-1257 (in Chinese).
- [15] 任翔, 邹颜秋硕, 汤晓召, 杨菁, 杨祖顺. 基于 ttrA 基因优化环介导等温扩增技术检测食品中沙门氏菌[J]. 食品科技, 2024, 49(4): 353-360.
- REN X, ZOU YQS, TANG XZ, YANG J, YANG ZS. Detection of *Salmonella* in food using ttrA gene optimized loop-mediated isothermal amplification technology[J]. *Food Science and Technology*, 2024, 49(4): 353-360 (in Chinese).
- [16] Bijo B, Renis M, Shehu F. Prevalence of *Salmonella* spp. in imported powdered infant formula (PIF)[J]. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 14(3): 236-240.
- [17] SANKARARAMAN S, VELAYUTHAN S. *Bacillus cereus*[J]. *Pediatrics in Review*, 2013, 34(4): 196-197.
- [18] 贺强, 廖娜, 陈丹. 乳粉中沙门氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌检验能力验证结果和关键控制点分析[J]. 质量安全与检验检测, 2024, 34(1): 77-83.
- HE Q, LIAO N, CHEN D. Analysis on the verification results of inspection capability and key control point of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in milk powder[J]. *Quality Safety Inspection and Testing*, 2024, 34(1): 77-83 (in Chinese).
- [19] BLACKWOOD BP, HUNTER CJ. *Cronobacter* spp. [J]. *Microbiology Spectrum*, 2016(4): 4.
- [20] 于芳, 王倩宁, 田欢欢, 吕雄, 张君霞. 石榴皮提取物对蜡样芽孢杆菌的抑菌活性及对细胞膜影响的研究[J/OL]. 食品与发酵工业, 2024. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.038548>.
- YU F, WANG QN, TIAN HH, LV X, ZHANG JX. Antibacterial activity of pomegranate peel extract against *Bacillus cereus* and its effect on cell membrane[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*, 2024. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.038548>.
- [21] 胡婵娟, 胡莉, 吴志豪, 戚俊峰. 食品安全快速检测技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2024(15): 162-164, 168.
- HU CJ, HU L, WU ZH, QI JF. The application of fast food safety detection technology in the detection of foodborne pathogens[J]. *China Food Safety Magazine*, 2024(15): 162-164, 168 (in Chinese).
- [22] 马惘卿, 包蕾, 向正华, 李旭东, 吴林蔚. 卫生微生物检验质控结果分析与探讨[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(6): 96-98.
- MA WQ, BAO L, XIANG ZH, LI XD, WU LW. Analysis and discussion on quality control results of sanitary microorganism test[J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2019, 29(6): 96-98 (in Chinese).
- [23] 王亚, 黄杰, 张加雪, 赵勇, 谌丽妃. 2016-2022 年江北区食品中常见致病菌检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2024, 21(3): 355-358.
- WANG Y, HUANG J, ZHANG JX, ZHAO Y, SHEN LF. Analysis of surveillance results of common pathogenic bacteria in food in Jiangbei district from 2016 to 2022[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2024, 21(3): 355-358 (in Chinese).
- [24] 田云. 四种食源性致病菌的 LAMP 快速检测方法的建立及应用[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2023.
- TIAN Y. Establishment and application of LAMP rapid detection method for four food-borne pathogens[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2023 (in Chinese).
- [25] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 李红娜, 李涛, 孙冬梅, 袁飞. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 297-305.
- WANG S, YANG YG, WU ZW, LI HN, LI T, SUN DM, YUAN F. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens[J]. *Food Science*, 2023, 44(9): 297-305 (in Chinese).
- [26] LI JB, WANG Y, HU JJ, BAO ZM, WANG MQ. An isothermal enzymatic recombinase amplification (ERA) assay for rapid and accurate detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in shrimp[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2023, 197: 107895.
- [27] 曾宇晨, 龚浪, 王京煜, 潘昊鸣, 梁杏玲, 马俊, 张桂红, 王衡. 基于 B646L、EP402R、MGF360/505 基因的非洲猪瘟病毒 ERA 检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 33-40.
- ZENG YC, GONG L, WANG JY, PAN HM, LIANG XL,

- MA J, ZHANG GH, WANG H. Development of ERA detection method for African swine fever virus based on *B646L*, *EP402R* and *MGF360/505* genes[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2021, 42(5): 33-40 (in Chinese).
- [28] 刘迪, 许鑫燕, 郑亚婷, 杨育鹏, 康洪涛, 姜睿, 杨鸣发, 刘家森, 曲连东. 猫疱疹病毒ERA-LFD检测技术的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(1): 11-18.
LIU D, XU XY, ZHENG YT, YANG YP, KANG HT, JIANG Q, YANG MF, LIU JS, QU LD. Establishment and application of ERA-LFD detection technology of feline herpesvirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(1): 11-18 (in Chinese).
- [29] DENG ZL, HU HY, TANG D, LIANG JX, SU XL, JIANG TQ, HU XP, YING WQ, ZHEN DS, XIAO XL, HE J. Ultrasensitive, specific, and rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* using the ERA/CRISPR-Cas12a dual system[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 811768.
- [30] 杨艳歌, 王帅, 李红娜, 李涛, 吴占文, 孙冬梅, 袁飞. 沙门氏菌ERA可视化快速检测方法的建立[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(10): 261-272.
YANG YG, WANG S, LI HN, LI T, WU ZW, SUN DM, YUAN F. Establishment of ERA visual rapid detection methods for *Salmonella*[J]. *Food Science*, 2023, 23(10): 261-272 (in Chinese).
- [31] 林志伟, 王帅, 王迎春, 吴占文, 李涛, 李红娜, 杨艳歌, 袁飞. 婴儿配方乳粉中食源性致病菌双重ERA快速检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2023, 44(18): 347-354.
LIN ZW, WANG S, WANG YC, WU ZW, LI T, LI HN, YANG YG, YUAN F. Establishment of a dual enzymatic recombinase amplification method for rapid detection of foodborne pathogens in infant formula powder[J]. *Food Science*, 2023, 44(18): 347-354 (in Chinese).
- [32] 兰全学, 陈佳平, 杨慧, 甘莉萍, 杜文旗, 刘渠, 金玉娟. 侧向流动型重组酶聚合酶扩增技术检测食品中大肠埃希氏菌O157[J]. *食品科技*, 2021, 46(1): 302-307.
LAN QX, CHEN JP, YANG H, GAN LP, DU WQ, LIU Q, JIN YJ. The detection method for *Escherichia coli* O157 based on lateral flow-based recombinase polymerase amplification[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(1): 302-307 (in Chinese).
- [33] 刘立兵, 南汇珠, 孙晓霞, 姜彦芬, 王金凤, 王建昌. 食品中蜡样芽胞杆菌实时荧光RPA检测方法的建立与应用[J]. *食品科学技术学报*, 2018, 36(1): 89-94.
LIU LB, NAN HZ, SUN XX, JIANG YF, WANG JF, WANG JC. Development and application of real-time recombinase polymerase amplification assay for detection of *Bacillus cereus* in food[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 36(1): 89-94 (in Chinese).
- [34] 刘婧文, 凌莉, 黄成栋, 王菊芳, 蒋丽婷, 李志勇. 实时荧光重组酶聚合酶扩增检测大肠埃希氏菌O157[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 6093-6103.
LIU JW, LING L, HUANG CD, WANG JF, JIANG LT, LI ZY. Detection of *Escherichia coli* O157 by real-time fluorescence recombinase polymerase amplification[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(17): 6093-6103 (in Chinese).
- [35] 蔡欣, 王源林, 赵杰, 匡衡, 孙学伟, 刘宗财, 崔茜, 杨展, 汪茂荣. 重组酶介导的肠出血性大肠杆菌O157:H7等温扩增方法的建立[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(9): 1235-1239, 1252.
CAI X, WANG YL, ZHAO J, KUANG H, SUN XW, LIU ZC, CUI Q, YANG Z, WANG MR. Establishment of recombinase-aided amplification method for EHEC O157:H7[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2022, 42(9): 1235-1239, 1252 (in Chinese).
- [36] 王淑娟, 范一灵, 冯震, 蒋波, 宋明辉, 李琼琼, 刘浩, 秦峰, 杨美成. 多酶恒温核酸快速扩增法检测大肠杆菌O157:H7[J]. *上海预防医学*, 2022, 34(6): 511-518.
WANG SJ, FAN YL, FENG Z, JIANG B, SONG MH, LI QQ, LIU H, QIN F, YANG MC. Multi-enzyme isothermal rapid amplification assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2022, 34(6): 511-518 (in Chinese).
- [37] 牟丹. 实时荧光重组酶介导的核酸扩增方法快速检测牛奶中大肠杆菌O157:H7的研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2022.
MU D. Study on real-time fluorescent recombinase-aided amplification for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2022 (in Chinese).
- [38] 渠洋. 水产品常见病原菌real-time RPA检测方法的建立和效果评价[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2021.
QU Y. Establishment and effect evaluation of real-time RPA detection method for common pathogenic bacteria in aquatic products[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [39] 国家市场监督管理总局. 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 (in Chinese).
- [40] 国家市场监督管理总局. 出口食品中蜡样芽胞杆菌快速检测方法 实时荧光定量PCR法: SN/T 3932—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Rapid detection of *Bacillus cereus* for export foods—real-time PCR method: SN/T 3932—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese).
- [41] 袁婵, 张一波, 蒋卓言, 郭若冰. 二甲基亚砜的医学应用及研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2024, 40(19): 3381-3386.
YUAN C, ZHANG YB, JIANG ZY, GUO RB. Medical application and research progress of dimethyl sulfoxide[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2024, 40(19): 3381-3386 (in Chinese).
- [42] 李俊. 青枯菌噬菌体特征及保护方法研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2022.
LI J. Study on phage characteristics and protection methods of *Ralstonia solanacearum*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2022 (in Chinese).