多重聚合酶链式反应技术检测罗非鱼 5 种常见食源性致病菌

杨亚琨, 刘永杰, 董雨豪*

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘 要: 目的 建立一种可同时检测无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门菌(*Salmonella*) 5 种罗非鱼常见食源性致病菌的多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)方法。**方法** 根据 5 种致病菌特异性基因片段设计并合成引物, 优化多重 PCR 体系条件, 并对多重 PCR 体系的特异性、灵敏度以及人工模拟样品进行检测。**结果** 建立的多重 PCR 方法可同时扩增 5 种目的菌株的特异性条带, 且不与非靶标细菌发生交叉反应。敏感性实验结果显示, 该方法对无乳链球菌、嗜水气单胞菌、沙门菌、霍乱弧菌、大肠杆菌纯培养物基因组 DNA 的检出限均为 0.4 ng/μL。人工模拟样品检测结果显示, 该方法可以快速且准确地检测上述 5 种食源性致病菌, 且检出限可达到 2×10^1 CFU/g。**结论** 本研究建立了一种可同时检测无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌和沙门菌 5 种罗非鱼常见食源性致病菌的多重 PCR 检测方法。该方法的建立为罗非鱼常见食源性致病菌的快速检测提供了重要的技术手段。

关键词: 罗非鱼; 食源性致病菌; 多重聚合酶链式反应; 快速检测

Determination of 5 kinds of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus* by multiplex polymerase chain reaction technology

YANG Ya-Kun, LIU Yong-Jie, DONG Yu-Hao*

(*College of Veterinary Medicine*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 5 kinds of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus*, including *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* and *Salmonella* by multiplex polymerase chain reaction (PCR). **Methods** Primers were designed and synthesized according to specific gene fragments of 5 kinds of pathogenic bacteria. The conditions of multiplex PCR system were optimized, and the specificity, sensitivity and artificial simulation samples of multiplex PCR system were detected. **Results** The established multiplex PCR method could simultaneously amplify the specific bands of 5 kinds of target strains without cross-reaction with non-target bacteria. The sensitivity test showed that the limit of detection of this multiplex PCR method was 0.4 ng/μL for the genomic DNA of pure cultures of *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*. The artificially

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605400)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605400)

***通信作者:** 董雨豪, 博士, 副研究员, 主要研究方向为水产病原菌检测及致病机制研究。E-mail: dongyuhao@njau.edu.cn

***Corresponding author:** DONG Yu-Hao, Ph.D, Associate Professor, Nanjing Agricultural University, No.1, Weigang, Xuanwu District, Nanjing 210095, China. E-mail: dongyuhao@njau.edu.cn

simulated sample testing showed that this method could quickly and accurately detect the above 5 kinds of foodborne pathogens, and the limit of detection could reach 2×10^1 CFU/g for each pathogen. **Conclusion**　A quintuple PCR method to identify 5 kinds of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus* has been developed in this study. The establishment of this method provides an important technical means for the rapid detection of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus*.

KEY WORDS: *Oreochromis niloticus*; foodborne pathogens; multiplex polymerase chain reaction; rapid detection

0　引　言

罗非鱼是我国出口的最主要的水产品之一, 作为世界上最大的罗非鱼出口国, 我国每年的罗非鱼产量占全世界产量的 50%以上, 罗非鱼产品安全在我国食品安全中占有不可忽视的地位[1−2]。食源性致病菌目前已成为危害罗非鱼食品安全, 影响人类身体健康的一个关键问题, 准确、快速检测罗非鱼中的食源性致病菌是控制食源性疾病暴发的必要手段。目前罗非鱼食源性致病菌的检测主要是针对无乳链球菌[3−7], 对其他致病菌的检测相对较少。然而, 有研究表明罗非鱼在产品加工、包装、运输、储藏、销售等环节会因接触到环境中的多种病原菌而污染[8]。黎小正等[9]对广西省罗非鱼食源性致病菌污染情况的调查结果显示无论是采自养殖场的罗非鱼样品还是市售罗非鱼样品, 均能检测出无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、沙门菌(*Salmonella*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等多种食源性致病菌。李来好等[10]对采自广东省不同区域养殖场的罗非鱼样品检测结果显示, 大肠杆菌、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)和嗜水气单胞菌检出率较高, 其次为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等。因此, 亟需建立一种快速、灵敏和特异性强的致病菌检测技术以预防和控制罗非鱼水产品食源性疾病的发生。

目前, 水生动物致病菌的检测通常采用常规培养分离和生化鉴定等技术。这种方法检测周期长、操作复杂、且检测单一, 很难适应现代化食品安全快速检测的需要[11−12]。尽管一些学者已经开发出可同时检测多种致病菌的多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法[13−15], 例如, 胡宗云等[16]建立了可同时检测 3 种淡水鱼致病菌的多重 PCR 检测方法; 蒋蔚等[17]建立针对水产品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的三重 PCR 检测方法; 王璐等[18]根据细胞兴奋性肠毒素基因和气溶素结构基因, 建立了可快速检测嗜水气单细胞菌双重 PCR 方法, 但这些方法仅能检测 1~3 种致病菌, 检测范围依然狭小, 检测效率较低, 且不适用于罗非鱼多种食源性致病菌的检测。为了实现对罗非鱼常见食源性致病菌的快速、灵敏、高通量检测, 本研究以无乳链球菌 *ef-tμ* 基因、嗜水气单胞菌 *ompA* 基因、沙门菌 *invA* 基因、霍乱弧菌 *ompW* 基因、大肠杆菌 *phoA* 基因作为目标基因, 建立五重 PCR 检测体系, 为罗非鱼中 5 种常见食源性致病菌的快速高效检测提供重要的技术手段。

1　材料与方法

1.1　实验菌株

嗜水气单胞菌 NJ-35、无乳链球菌 GD201008-001、沙门菌 SD-1 由本实验室保存; 霍乱弧菌 VC0901、大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌 ATCC21635、创伤弧菌 ATCC27562 (*Vibrio vulnificus* ATCC27562)、副溶血性弧菌 SH112、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (*Staphylococcus aureus* ATCC6538)、阪崎肠杆菌 CICC21561 由上海兽医研究所蒋蔚研究员惠赠。

1.2　试剂与仪器

琼脂糖(纯度 99%, 凝胶强度≥1200 g/cm^2, 南京鼎国生物技术有限公司); 2×Taq PCR Mastermix (P111-01)、DNA Marker (MD101-01)(南京诺唯赞生物科技有限公司); 细菌基因组提取试剂盒(D3350-01, 美国 OMEGA Bio-Tek 公司); THB 培养基(HB0311, 青岛海博生物技术有限公司); 胰蛋白胨、酵母提取物(美国 Oxoid 公司); 无水乙醇(分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司)。

DYY-2C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司); NanoDrop 2000c Nano-Drop 核酸蛋白测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Mastercycler nexus PCR 扩增仪、5424 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); Biorad Smartspec Plus 分光光度计、Gel Doc XR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3　细菌基因组 DNA 提取

采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。DNA 浓度采用 Nano Drop 仪器测定后, 置于–20℃冰箱中储存备用。

1.4　引物设计与合成

从 GenBanK 数据库分别下载已发布的无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌和沙门菌的全基因组序列, 经比较基因组学分析, 筛选保守的靶基因, 根据保守基因序列[无乳链球菌 *ef-tμ* 基因(Gene ID: 61438066)、嗜

水气单胞菌 *ompA* 基因(Gene ID: 64360321)、霍乱弧菌 *ompW* 基因(Gene ID: 69721547)、大肠杆菌 *phoA* 基因(Gene ID: 914535)和沙门菌 *invA* 基因(Gene ID: 1254419)], 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列及相关信息见表 1。

1.5 单一引物 PCR 扩增

分别以 5 种靶标细菌的 DNA 作为模板, 进行单一 PCR 扩增。反应条件: 2×Taq Mix 20 μL, 引物各 1 μL(终浓度为 0.2 μmol/L), DNA 模板 1 μL(质量浓度为 10 ng/μL), 加 ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 72℃延伸 15 s, 30 个循环; 72℃终延伸 5 min。取 6 μL 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。

1.6 多重 PCR 反应体系的建立及优化

初步建立多重 PCR 反应体系: 2×Taq Mix 20 μL、引物各 1 μL(终浓度为 0.2 μmol/L), 5 种目的菌株的 DNA 各 1 μL 为模板, 加 ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 72 ℃延伸 15 s, 30 个循环; 72℃终延伸 5 min。

1.6.1 引物浓度优化

设置各对引物浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 μmol/L, 其他参数如同 1.6 进行多重 PCR 扩增, 确定最佳引物浓度。

1.6.2 退火温度优化

设置退火温度分别为 50.9、52.9、55.0、57.1、59.1、61.1℃, 其他参数如同 1.6 进行多重 PCR 扩增, 确定最佳退火温度。

1.6.3 退火时间优化

设置退火时间分别为 15、20、25、30、35、40 s, 其他参数如同 1.6 进行多重 PCR 扩增, 确定最佳退火时间。

1.6.4 循环数优化

分别设置扩增循环数为 26、28、30、32、34、36。其他参数如同 1.6 进行多重 PCR 扩增, 确定最佳循环数。

1.7 多重 PCR 特异性实验

将 5 种靶标细菌和 5 种非靶标细菌(副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌、单核细胞增生李斯特菌、阪崎肠杆菌)的基因组 DNA 与 5 对特异性引物组合进行 PCR 反应, 组合方式如下: 第 1 组: 5 对特异性引物与 5 种靶标菌株的基因组 DNA, 作为阳性对照组; 第 2 组: 5 对特异性引物与 5 种靶标菌株和 5 种非靶标菌株的基因组 DNA; 第 3 组: 5 对特异性引物与 5 种非靶标菌株的基因组, 作为阴性对照组。按照已优化的多重 PCR 反应体系进行扩增, 扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.8 多重 PCR 敏感性实验

将 5 种靶标细菌的基因组 DNA 质量浓度分别调至 20 ng/μL, 按 10^1~10^8 梯度进行稀释, 以各梯度 5 种靶标细菌 DNA 等体积混合液作为模板, 采用优化后的多重 PCR 反应体系进行扩增, 确定多重 PCR 灵敏度。

1.9 人工模拟样品的多重 PCR 检测

无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌以及沙门菌过夜培养后, 菌液浓度调至 5×10^7 CFU/mL, 并进行 10 倍比梯度稀释。每个梯度分别取 200 μL 菌液混合到 1 个 EP 管中。取罗非鱼鳃组织 5 g, 无菌操作下剪碎、研磨, 分别加入不同浓度梯度的混合菌液 100 μL, 充分混匀后, 置于含 10 mL 增菌液的锥形瓶中, 37℃培养 12 h, 分别取 0.5 mL 培养液采用试剂盒法提取基因组 DNA。按照优化后多重 PCR 体系进行扩增并通过 1.5%琼脂糖核酸凝胶电泳进行结果分析。

2 结果与分析

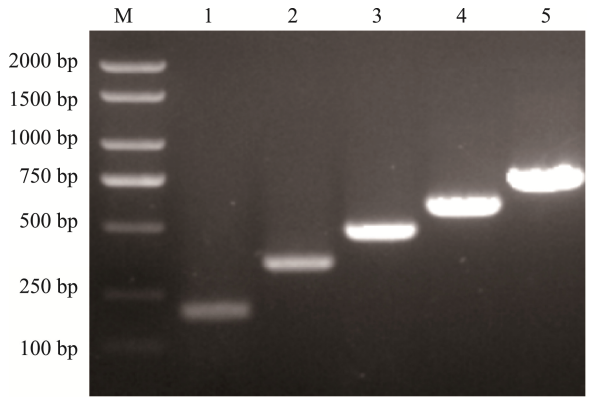
2.1 单一 PCR 扩增结果

以无乳链球菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、霍乱弧菌和沙门菌基因组为模板, 利用自行设计的引物扩增目的片段。结果显示, 扩增条带分别为 150、349、474、588、830 bp, 与目的条带大小相符(图 1), 且条带清晰明亮, 无杂带。

表 1 本文所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

目标基因	引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
invA	*invA-F* *invA-R*	GTTTTACTCCTGACGCCAAAATTGTC GCGAATACGTTGTTTCACAGTACTG	830
ompA	*ompA-F* *ompA-R*	GTAGTACGCTTCCGCAAGATTG CAAGCTTCCGCGTCAAAATCTAC	349
ompW	*ompW-F* *ompW-R*	CACCAAGAAGGGTGACTTTATTGTG GAACTTATAACCACCCCGCG	588
phoA	*phoA-F* *phoA-R*	CGTTTCTACCGCAGAGTTG GTCATCTGTGCCAGGGTC	474
ef-tμ	*ef-tμ-F* *ef-tμ-R*	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC ACGTTCGATTTCATCACGTTG	150



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1 为无乳链球菌; 2 为嗜水气单胞菌; 3 为大肠杆菌; 4 为霍乱弧菌; 5 为沙门菌。

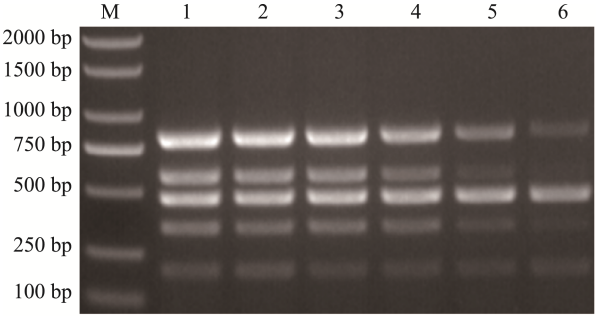
图 1　单一 PCR 鉴定结果

Fig.1　Identification results of single PCR

2.2　多重 PCR 扩增条件的优化

2.2.1　退火温度优化

分别以 50.9、52.9、55.0、57.1、59.1、61.1℃为退火温度对多重 PCR 体系进行扩增。结果显示, 当退火温度为 50.9~57.1℃时, 扩增条带较为清晰, 当退火温度大于 57.1℃时, 无乳链球菌、嗜水气单胞菌和霍乱弧菌的目的条带较为模糊(图 2)。综合各条带清晰程度, 确定最佳退火温度为 52.9℃。



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~6 分别为退火温度分别为 50.9、52.9、55.0、57.1、59.1、61.1℃。

图 2　退火温度优化

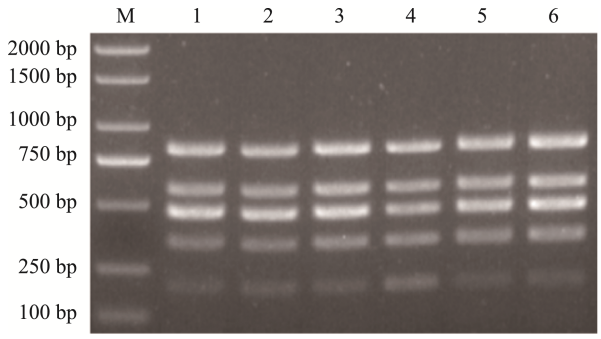
Fig.2　Optimization of annealing temperature

2.2.2　退火时间优化

退火时间设定为 15、20、25、30、35、40 s 对多重 PCR 体系进行优化。结果如图 3 所示, 当退火时间为 30 s 时, 各目的条带较清晰, 所以最佳退火时间为 30 s。

2.2.3　循环数优化

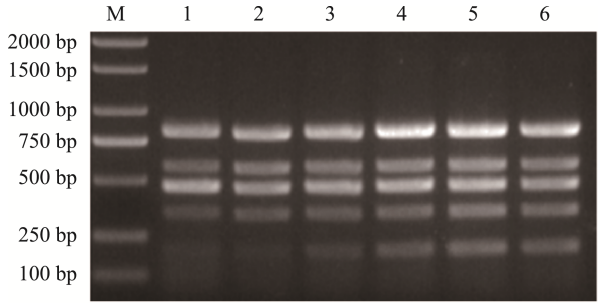
分别以 26、28、30、32、34、36 为循环数对多重 PCR 体系进行优化。结果如图 4 所示, 当循环数为 32、34、36 时, 扩增效果良好且无明显差异, 考虑到快速检测的需要, 故将循环数确定为 32。



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~6 分别为退火时间分别为 15、20、25、30、35、40 s。

图 3　退火时间优化

Fig.3　Optimization of annealing time



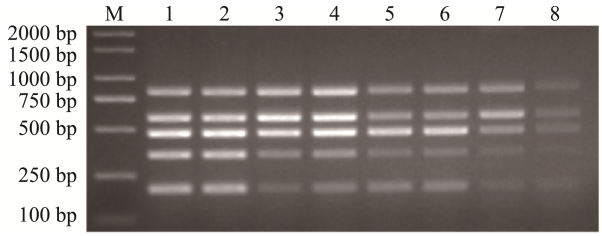
注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~6 分别为循环数分别为 26、28、30、32、34、36。

图 4　循环数优化

Fig.4　Optimization of cycle number

2.2.4　引物浓度优化

分别设置引物浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 μmol/L 进行多重 PCR 扩增。结果如图 5 所示沙门菌、霍乱弧菌、大肠杆菌的最佳引物浓度为 0.8 μmol/L, 无乳链球菌、嗜水气单胞菌最佳引物浓度为 1.2 μmol/L。



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~8 分别为引物浓度分别为 1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/L。

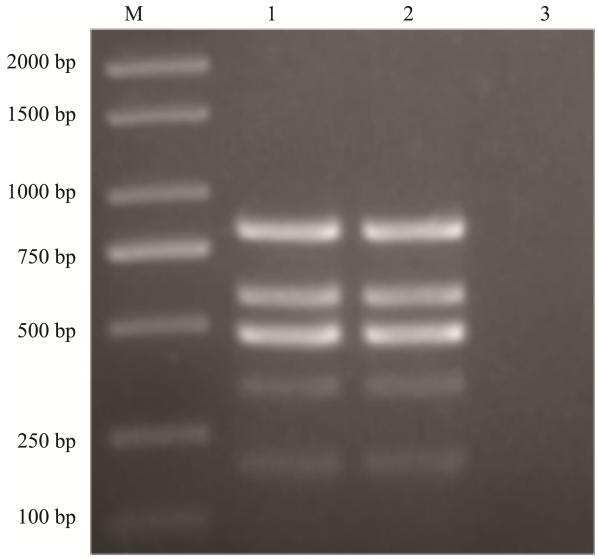
图 5　引物浓度优化

Fig.5　Optimization of primer concentration

2.3　多重 PCR 特异性验证

对建立的多重 PCR 方法进行特异性验证, 结果表明, 以无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌和沙门菌混合基因组为模板可以扩增预期片段; 以 5

种靶标细菌和 5 种非靶标细菌的混合基因组为模板时，无杂带扩增；以 5 种非靶标细菌的混合基因组为模板时，无核酸条带扩增(图 6)，表明构建多重 PCR 方法特异性良好。



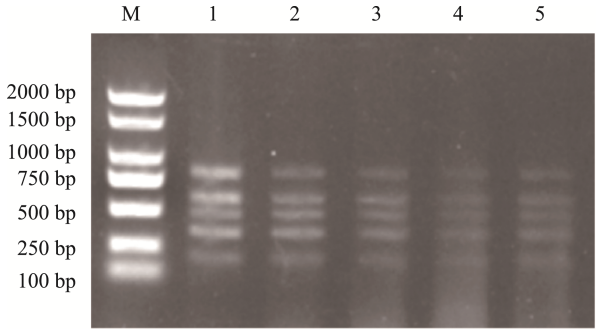
注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1 为无乳链球菌+嗜水气单胞菌+霍乱弧菌+大肠杆菌+沙门菌; 2 为无乳链球菌+嗜水气单胞菌+霍乱弧菌+大肠杆菌+沙门菌+副溶血弧菌+金黄色葡萄球菌+创伤弧菌+单核细胞增生李斯特菌+阪崎肠杆菌; 3 为副溶血弧菌+金黄色葡萄球菌+创伤弧菌+单核细胞增生李斯特菌+阪崎肠杆菌。

图 6 多重 PCR 特异性检测

Fig.6 Specificity test of multiplex PCR

2.4 多重 PCR 敏感性测定

将 5 种靶标细菌的基因组混合液 10 倍梯度稀释，对多重 PCR 的敏感性进行测定。结果显示，无乳链球菌、嗜水气单胞菌、沙门菌、霍乱弧菌、大肠杆菌的灵敏度均在 0.4 ng/μL(对应的纯菌浓度为 10^3 CFU/mL)以上(图 7)。



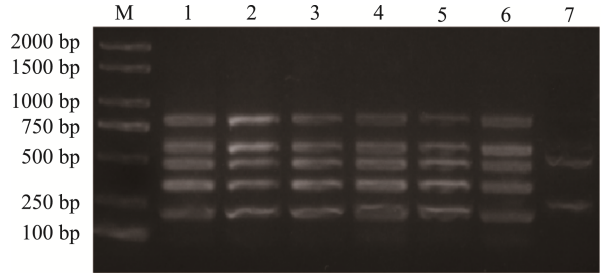
注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~5 为基因组浓度分别为 4×10^0、4×10^{-1}、4×10^{-2}、4×10^{-3}、4×10^{-4} ng/μL。

图 7 多重 PCR 灵敏度检测

Fig.7 Sensitivity test of multiplex PCR

2.5 人工模拟样品的多重 PCR 检测

人工模拟样品评价结果显示，无乳链球菌、嗜水气单胞菌、沙门菌、霍乱弧菌、大肠杆菌的灵敏度均为 2×10^1 CFU/g，且扩增条带清晰明显，扩增效果好(图 8)，表明本研究建立的多重 PCR 检测方法可满足检测需要。



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~7 为菌液浓度分别为 2×10^6、2×10^5、2×10^4、2×10^3、2×10^2、2×10^1、2×10^0 CFU/g。

图 8 人工模拟样品灵敏度评价

Fig.8 Sensitivity evaluation of the artificially simulated sample

3 讨论与结论

本研究针对无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌和沙门菌 5 种罗非鱼常见食源性致病菌构建多重 PCR 检测方法，针对各细菌的保守基因设计特异性引物，并对多重 PCR 体系的退火温度、退火时间、循环数和引物浓度等条件进行优化。结果显示本研究设计的 5 对引物特异性好，不存在相互干扰，优化后的多重 PCR 方法可以对混合基因组 DNA 进行特异性扩增，对其他 5 种非把标菌株无扩增。

本研究采用模板稀释法来确定多重 PCR 的灵敏度，这种方法在鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)[19]、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)[16]、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)[20]等多种致病菌的多重 PCR 检测中也有应用，但有些研究将菌液梯度稀释后再提取基因组作为模板进行检测[21–22]，这种方法提取 DNA 的量会受试剂盒效率、个人操作等多种因素影响，由此得到的灵敏度会存在较大误差，不利于检出限的判定。人工污染样品检测结果表明，本研究建立的多重 PCR 检测方法对无乳链球菌、嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、大肠杆菌和沙门菌的灵敏度均可达 2×10^1 CFU/g。马新秀[23]针对生鲜食品中食源性致病菌构建的五重 PCR 检测技术，对大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌的检出限为 1.0×10^6 CFU/mL，对单核细胞增生李斯特菌的检出限为 1.5×10^6 CFU/mL。母润红等[24]建立的四重 PCR 检测技术对水产品中沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌和霍乱弧菌的检出限为 10^4 CFU/mL，对副溶血性弧菌的检出限为 10^7 CFU/mL。CHIANG 等[25]针对金黄色葡萄球菌、沙门菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌构建的

多重 PCR 检测技术的检出限为 10^3~10^4 CFU/mL。与之相比, 本研究建立的五重 PCR 检测技术的敏感性明显较强, 可大大提高检测的准确性。王豪杰等[26]针对不同血清型多杀性巴氏杆菌构建的多重 PCR 检测方法的检出限可达 10^2 CFU/mL。易青等[27]建立的三重 PCR 检测方法对沙门菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的检出限可达 10^2 CFU/mL。李聪等[28]针对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌和沙门氏菌 4 种食源性致病菌构建的多重 PCR 检测方法的检出限也可达 10^2 CFU/mL, 但本研究构建的多重 PCR 方法可同时检测 5 种致病菌, 增大了检测范围, 不仅节省了检测时间, 而且成本更低。童桂香等[29]构建的四重 PCR 检测技术对沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低检出限为 10^2 CFU/mL, 对志贺氏菌最低检出限为 10 CFU/mL。与之相比, 本研究构建的多重 PCR 灵敏度略低, 分析原因可能是引物数量较多, 导致形成引物二聚体的几率增大, 从而使其灵敏度降低。另外, 申纪饶等[30]针对奶牛乳腺炎 5 种病原菌构建的多重 PCR 检测方法的增菌时间需要 24 h, 而本研究构建的多重 PCR 检测方法增菌时间仅需 12 h, 检测时间明显缩短。

综上所述, 本研究建立的多重 PCR 检测方法可对罗非鱼水产品中 5 种常见食源性致病菌进行快速检测, 且具有良好的特异性和灵敏性。整个过程包括细菌扩大培养、总 DNA 提取、PCR 扩增和电泳分析, 可在 16 h 内完成, 符合水产品快速检测的需求, 具有广泛的应用前景。

参考文献

[1] 李亚男, 高峰, 陈宗馥, 等. 罗非鱼湖病毒病及其检测技术研究进展[J]. 水产养殖, 2022, 43(8): 27–34.
LI YN, GAO F, CHEN ZF, *et al*. Research progress on *Oreochromis niloticus* lake virus disease and its diagnostic technology [J]. J Aquacul, 2022, 43(8): 27–34.

[2] DING Y, WU ZQ, ZHANG RJ, *et al*. Spatial distribution, source identification, and risk assessment of organochlorines in wild tilapia from Guangxi, South China [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 15179.

[3] CUI M, ZHANG H, LI JJ, *et al*. Differential PCR detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by a single primer pair [J]. J Fish Dis, 2019, 42(8): 1211–1216.

[4] HE RZ, XU J, WANG J, *et al*. Quantitative detection of streptococcosis infection in dead samples of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. J Appl Microbiol, 2020, 129(5): 1157–1162.

[5] WU WD, LI M, CHEN M, *et al*. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in tilapia [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 91: 66–69.

[6] 李永福, 李敏, 叶毅飞, 等. 一株罗非鱼无乳链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(5):127–135.
LI YF, LI M, YE YF, *et al*. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility test of *Streptococcus agalactiae* in tilapia [J]. China Anim Heal Inspect, 2022, 39(5): 127–135.

[7] 袁橙, 陈怀君, 袁圣, 等. 福建省漳州市罗非鱼无乳链球菌分离鉴定及毒力基因和耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(9): 3655–3664.
YUAN C, CHEN HJ, YUAN S, *et al*. Isolation, identification and study on virulence gene and drug resistance of *Streptococcus agalactiae* from tilapia in Zhangzhou city, Fujian Province [J]. China Anim Husb Vet Med, 2022, 49(9): 3655–3664.

[8] 丁秀琼, 聂芳红, 孙良娟, 等. 2012 年-2015 年湛江市出口罗非鱼微生物污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(5): 718–723.
DING XQ, NIE FH, SUN LJ, *et al*. Investigation of microbial contamination status in tilapia for exportion in Zhanjiang from 2012 to 2015 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2017, 27(5): 718–723.

[9] 黎小正, 童桂香, 吴祥庆, 等. 2011~2012 年广西罗非鱼食源性致病菌及其药敏特性调查[J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1914–1918.
LI XZ, TONG GX, WU XQ, *et al*. An investigation on food borne pathogens and its antibiotic sensitivity isolated from tilapia in Guangxi during 2011-2012 [J]. J South Agric, 2013, 44(11): 1914–1918.

[10] 李来好, 吴燕燕, 李凤霞, 等. 广东省罗非鱼及其养殖环境中食源性致病菌菌相分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 823–831.
LI LH, WU YY, LI FX, *et al*. Analysis on food borne pathogenic microorganism of tilapia and cultivation environment in guangdong province [J]. J Fish China, 2009, 33(5): 823–831.

[11] 冯波, 谢文佳, 张晓光, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(11): 290–296.
FENG B, XIE WJ, ZHANG XG, *et al*. Research progress on rapid detection technology of foodborne pathoge [J]. Food Sci Technol, 2022, 47(11): 290–296.

[12] 陈万义, 蒋飞, 邓睿. 食源性病原菌不同检测方法的比较研究进展[J]. 河南工业大学学报. 2022, 43(5): 116–124.
CHEN WY, JIANG F, DENG R. Comparison study on different determination methods for the same food borne pathogen [J]. J Henan Univ Technol, 2022, 43(5): 116–124.

[13] SARAH G, BLANCA MP, NICHOLAS AF. Multiplex PCR assay for clade typing of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(6): e0318222.

[14] PLATENIK MO, ARCHER L, KHER L. Prevalence of *mecA*, *mecC* and panton-valentine-leukocidin genes in clinical isolates of coagulase positive *Staphylococci* from dermatological canine patients [J]. Microorganisms, 2022, 10: 2239.

[15] HONG YM, JI RY, WANG ZY. Development and application of a multiplex PCR method to differentiate *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from its monophasic variants in pig farms [J]. Food Microbiol, 2023, 109: 104135.

[16] 胡宗云, 杨培民, 闫有利. 3 种淡水鱼病原菌多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 水产科学, 2022, 41(4): 605–613.
HU ZY, YANG PM, YAN YL. Establishment and application of multiplex PCR assay for detection of three major freshwater pathogens [J]. Fish Sci, 2022, 41(4): 605–613.

[17] 蒋蔚, 易力, 陈永军, 等. 水产品中霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1): 44–51.
JIANG W, YI L, CHEN YJ, *et al*. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Vibrio*

parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in aquatic foods [J]. Chin J Anim Infect Dis, 2016, 24(1): 44–51.

[18] 王璐, 梁利国, 谢骏, 等. 嗜水气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 水产科学, 2013, 32(4): 219–223.
WANG L, LIANG LG, XIE J, *et al*. Development and application of duplex PCR for detection of bacterium *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Sci, 2013, 32(4): 219–223.

[19] 成翔宇, 冯春明, 马红丽, 等. 水产动物主要致病弧菌多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 养殖与饲料, 2019, 4: 22–24.
CHENG XY, FENG CM, MA HL, *et al*. Establishment and application of multiplex PCR for detection of pathogenic *Vibrio* in aquatic animals [J]. Anim Breed Feed, 2019, 4: 22–24.

[20] 叶方钰, 刘爽, 王权, 等. 奶牛乳房炎三种主要链球菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2022. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2023.0028
YE FY, LIU S, WANG Q, *et al*. Development of multiplex PCR for detection of *Streptococcus* in bovine mastitis [J]. Chin Vet Sci, 2022. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2023.0028

[21] 胡慧, 李田美, 姜艳芬. 蜡样芽孢杆菌、产色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌三重 PCR 检测方法建立与应用[J]. 动物医学进展, 2022, 43(7): 1–6.
HU H, LI TM, JIANG YF. Establishmentand application of tirplex PCR method for detecting *B.cereus*, *S. chromogenes* and *K. pneumoniae* [J]. Prog Vet Med, 2022, 43(7): 1–6.

[22] 杨国兴, 杨立新, 李伟昊. 多重 PCR 检测 4 种常见食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6289–6295.
YANG GX, YANG LX, LI WH. Detection of four common foodborne pathogens by multiplex PCR [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(18): 6289–6295.

[23] 马新秀. 生鲜食品中食源性病原微生物多重 PCR 检测技术的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
MA XX. Study on multiplex PCR detection of foodborne pathogenic microorganisms in fresh food [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.

[24] 母润红, 聂丹丹, 李明成, 等. 水产品中食源性病原菌多重 PCR 快速检测方法的建立[J]. 北华大学学报, 2020, 21(6): 756–760.
MU RH, NIE DD, LI MC, *et al*. Rapid detection of foodborne pathogenic bacteria by establishment of multi-PCR method [J]. J Beihua Univ, 2020, 21(6): 756–760.

[25] CHIANG YC, TSEN HY, CHEN HY, *et al*. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples [J]. J Microbiol Methods, 2012, 88: 110–116.

[26] 王豪杰, 辛凌翔, 任小侠, 等. 牛巴氏杆菌病多重 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5083-5091.
WANG HJ, XIN LX, REN XX, *et al*. Establishment and application of multiplex PCR assay for bovine pasteurellosis [J]. Microb China, 2022, 49(12): 5083-5091.

[27] 易青, 宁喜斌. 3 种食源性致病菌共增菌及三重 PCR 检测[J]. 卫生研究, 2022, 51(3): 470–475.
YI Q, NING XB. Co-enrichment and triple PCR detection of three foodborne pathogens [J]. J Hyg Res, 2022, 51(3): 470–475.

[28] 李聪, 刘健慧, 李志辉, 等. 4 种食源性致病菌的多重 PCR 快速检测方法研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 164–169.
LI C, LIU JH, LI ZH, *et al*. Study on multiplex PCR of rapid detection method for four foodborne pathogens [J]. Food Res Dev, 2019, 40(21): 164–169.

[29] 童桂香, 黎小正, 韦信贤, 等. 水产品中 4 种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 南方农业学报, 2015, 46(12): 2217–2222.
TONG GX, LI XZ, WEI XX, *et al*. Establishment of multiplex-PCR method for detecting four foodborne pathogenic bacteria in aquatic products [J]. J South Agric, 2015, 46(12): 2217–2222.

[30] 申纪饶, 王丹, 李新圃, 等. 奶牛乳腺炎 5 种病原菌多重 PCR 快速检测方法的建立与评价[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(5): 507–533.
SHEN JR, WANG D, LI XP, *et al*. Establishment and evaluation of multiplex PCR rapid diagnosis method for five pathogens of bovine mastitis [J]. Chin J Prev Vet Med, 2021, 43(5): 507–533.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介

杨亚琨, 博士研究生, 主要研究方向为病原菌检测技术开发。
E-mail: 2020807150@stu.njau.edu.cn

董雨豪, 博士, 副研究员, 主要研究方向为水产病原菌检测及致病机制研究。
E-mail: dongyuhao@njau.edu.cn