

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240729006

多重实时聚合酶链式反应法快速检测食品中的产志贺毒素大肠埃希氏菌

赵芳^{1,2}, 牛娜^{1,2}, 刘莹^{1,2}, 涂晓波^{1,2}, 刘慧玲^{1,2}, 金晓蕾^{1,2}, 吕敬章^{1,2*}

(1. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 深圳 518045; 2. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳 518045)

摘要: **目的** 建立多重实时聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法快速检测食品中的产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)的方法。**方法** 以产志贺毒素大肠埃希氏菌携带的毒力基因 *stx1*、*stx2* 和黏附基因 *eae* 靶基因引物探针建立多重实时 PCR 体系, 并采用原位冻干技术将 PCR 反应体系和阳性质控品进行了预先分装冻干, 制成稳定、便捷的即用型反应体系, 随后对方法的灵敏性、特异性和稳定性进行评价。**结果** 所建立的多重实时 PCR 法检测 *eae*、*stx1*、*stx2* 基因的灵敏性为 10^2 CFU/mL。与 32 种非 STEC 菌均无交叉反应。整体检测时长可控制在 1 h 以内, 冻干体系可在常温条件下保存 1 年以上。**结论** 本方法快速、简便, 适用于测定食品中的 STEC。

关键词: 快速检测; 多重实时聚合酶链反应技术; 产志贺毒素大肠埃希氏菌; 冻干

Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food by multiple real-time polymerase chain reaction

ZHAO Fang^{1,2}, NIU Na^{1,2}, LIU Ying^{1,2}, TU Xiao-Bo^{1,2}, LIU Hui-Ling^{1,2},
JIN Xiao-Lei^{1,2}, LV Jing-Zhang^{1,2*}

(1. Shenzhen Customs, People's Republic of China, Shenzhen 518045, China;

2. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518045, China)

ABSTRACT: Objective To establish a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) method for rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Methods** A multiplex PCR system was established using target gene primers of virulence genes *stx1*, *stx2* and adhesion gene *eae* carried by STEC. The PCR reaction system and positive control samples were pre-packed and lyophilized using in situ lyophilization technology to create a stable, convenient, ready-to-use reaction system. Subsequently, the sensitivity, specificity and stability of the method were evaluated. **Results** The sensitivity of the multiplex fluorescent PCR method established for detecting *eae*, *stx1*, and *stx2* genes was 10^2 CFU/mL. There was no cross reaction with 32 non-STEC bacteria. The overall detection time can be controlled within 1 h, and the lyophilized system can be stored at room temperature for more than 1 year. **Conclusions** The method is rapid, simple and suitable for the determination of STEC in food.

KEY WORDS: rapid detection; multiplex real-time polymerase chain reaction; Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; freeze drying

基金项目: 海关总署科研项目(2022HK026、2024HK010)

Fund: Supported by the Research Project of General Administration of Customs (2022HK026, 2024HK010)

*通信作者: 吕敬章, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

*Corresponding author: LV Jing-Zhang, Professor, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, No.1011 Fuqiang Road, Shenzhen 518045, China. E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn

0 引 言

产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)可引起人类水样腹泻、出血性肠炎以及溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)。STEC 感染后的症状表现因人而异, 并发 HUS 后, 肾脏可能会停止工作并产生其他严重的问题。多数合并 HUS 的患者会在几周内治愈, 但有些会产生永久性损害甚至死亡^[1]。据报道, 人类摄入低于 100 CFU 的 STEC 就可能导致患病, STEC 已成为严重威胁人类健康的重要致病菌^[2-3]。STEC 有 400 多种血清型^[4], 其中大肠埃希氏菌 O157、O26、O45、O103、O111、O121、O145 7 种血清型为排名前 7 的主要致病型, 因其致病力强, 因此美国很早就开始在生牛肉及其制品中强制检验这 7 种 STEC^[4]。

由于样本中往往同时存在多种与 STEC 生化特性相似的背景菌, 且目前尚未发现完全可靠的分离培养基^[5-6], 致使对 STEC 的分离鉴定十分困难, 过程耗时费力且容易造成漏检。而针对性检测毒力基因的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)可对 STEC 进行特异性识别, 相较传统方法灵敏度更高、可操作性更强, 成为目前复杂基质中检测 STEC 的最适方法^[7-9]。研究发现, 具有产志贺毒素基因(*stx*)及黏附基因(*eae*)是引起严重疾病 STEC 的典型特征^[10], 因此对这 2 种基因的筛查成为各类 PCR 方法检测 STEC 的关键。我国于 2024 年发布的 GB 4789.49—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产志贺毒素大肠埃希氏菌检验》加入了 PCR 初筛步骤, 但仅涵盖了对 *stx* 基因的筛查而未涉及 *eae* 基因。可见, 在我国探索可同时检测 STEC 多种致病基因的多重实时 PCR 方法依然是及时溯源、采取针对性防控和赢得诊疗时间的努力方向。

实时 PCR 快速反应体系中含有多种试剂组分, 部分试剂组分(如酶及标记探针)对温度变化敏感且保质期短, 因此常须冷链运输和低温保存并避免反复冻融。为确保检测结果的准确性, 同时也为实现实时现场检测提供一种新的途径, 各国学者开始尝试采取冻干技术优化其反应体系, 获得可在室温条件下长时间运输储存的稳定体系^[11-14]。

本研究以产志贺毒素的两种主要基因型 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因为靶序列, 经优化各阶段反应时间, 建立快速检测 STEC 的多重实时 PCR 方法, 同时采用原位冻干技术将 PCR 反应体系和阳性质控品预先分装冻干, 制成稳定、便捷的即用型多重实时 PCR 反应体系, 并应用大肠埃希氏菌 O157、O26、O45、O103、O111、O121、O145 7 种血清型 STEC 菌株验证其特异性、灵敏度及稳定性, 以期 STEC 的快速筛查提供简便易行的解决方案。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

KB240 恒温培养箱(德国 BINDER 公司); SLAN-96S 荧光 PCR 仪器(上海宏石医疗科技有限公司); GZLY 医药型冻干机(北京松源华兴生物技术有限公司); NanoDrop 2000 核酸蛋白测定仪(美国 NanoDrop 公司)。

1.2 试剂与材料

1.2.1 试 剂
QIAamp DNA 试剂盒(编号 51304, 德国 Qiagen 公司); Real time PCR 反应液(编号 FM5071-NA)、4×冻干保护剂-9(编号: AS412-9, 珠海宝锐生物科技有限公司); petrifilm 菌落总数测试片(编号 33ADA6, 美国 3M 公司); 血平板(编号 2101023, 北京陆桥技术股份有限公司)。

1.2.2 实验菌株
实验用目标菌株和非目标菌株均为购买的标准菌株和经鉴定的实验室分离菌株。

1.2.3 引物探针
引物探针序列参考 ISO/TS 13136:2012, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物探针序列见表 1。

表 1 引物探针序列 Table 1 Primers and probes	
名称	序列
<i>eae-F</i>	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA
<i>eae-P</i>	HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ1
<i>eae-R</i>	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA
<i>stx-F</i>	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCYTTACG
<i>stx-R</i>	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC
<i>stx1-P</i>	FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTAA-BHQ1
<i>stx2-P</i>	Cy5-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-BHQ2

1.3 实验方法

1.3.1 菌种培养及 DNA 提取
将实验菌种过夜培养, 挑取菌落进行 DNA 提取。DNA 的提取按照 QIAamp DNA 试剂盒说明书进行, 并用 NanoDrop2000 核酸蛋白测定仪测定其浓度。

1.3.2 PCR 反应体系、冻干工艺及扩增条件
多重实时 PCR 25 μL 反应体系: 5 μL 5×Superstart Premix, 0.45 μL MgCl₂ (250 mmol/L), 4×冻干保护剂-9 6.25 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 探针 0.25 μL (10 μmol/L), 加水补足至 25 μL。

将配制好的 PCR 反应体系分装到 PCR 反应管中, 25 μL/管, 置于冻干机冻干, 冻干条件: -50 °C 300 min; -30 °C 720 min; 25 °C 300 min。冻干完成后置于铝箔袋中, 放入干燥剂, 室温真空密封保存。

阳性质控品冻干及使用：将肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 (CMCC 44828)基因组用 TE 缓冲液稀释至 10 ng/mL，加入 1/3 体积的 4×冻干保护剂，10 μL/管分装，冻干。冻干及储存方法程序参照 PCR 反应体系冻干程序。使用时，在管中加入 100 μL 超纯水，溶解冻干粉末。

多重实时 PCR 快速扩增条件：往 PCR 反应管中加入 25 μL DNA，溶解冻干粉，置于 PCR 仪上进行扩增：50 °C 1 min；95 °C 1 min；95 °C 1 s，60 °C 5 s(采集荧光)，40 个循环。

1.3.3 灵敏度实验

选取携带 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因的大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)接种于血平板，36 °C 培养过夜，挑取单个菌落用 0.85% 生理盐水配制成 0.5 麦氏单位的菌悬液(浓度约为 10⁸ CFU/mL)，用生理盐水将该菌悬液进行梯度稀释。取大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828)不同稀释度的菌液，按照建立的方法检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因，重复检测 3 次。同时，用 petrifilm 菌落总数测试片对菌液进行平板计数。

1.3.4 特异性实验

将 40 株携带或不携带 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因的菌株在血平板上 36 °C 过夜培养，按 1.3.1 提取菌株基因组 DNA。稀释菌株基因组 DNA，用所建立的方法检测

质量浓度为 100 ng/mL 的菌株基因组 DNA，检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因，每个检测做 3 个重复。

1.3.5 稳定性实验

将冻干的反应液、阳性质控品、阴性质控品(灭菌超纯水)置于 25 °C 1 年。用置于 25 °C 1 年的冻干反应体系和新冻干的反应体系同时检测大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828) *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因。

1.3.6 破坏性实验

将冻干的反应液、阳性质控品、阴性质控品(灭菌超纯水)置于 55 °C 1 个月。用置于 55 °C 1 个月的冻干反应液和新冻干的反应体系同时检测大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株(CMCC 44828) *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因。

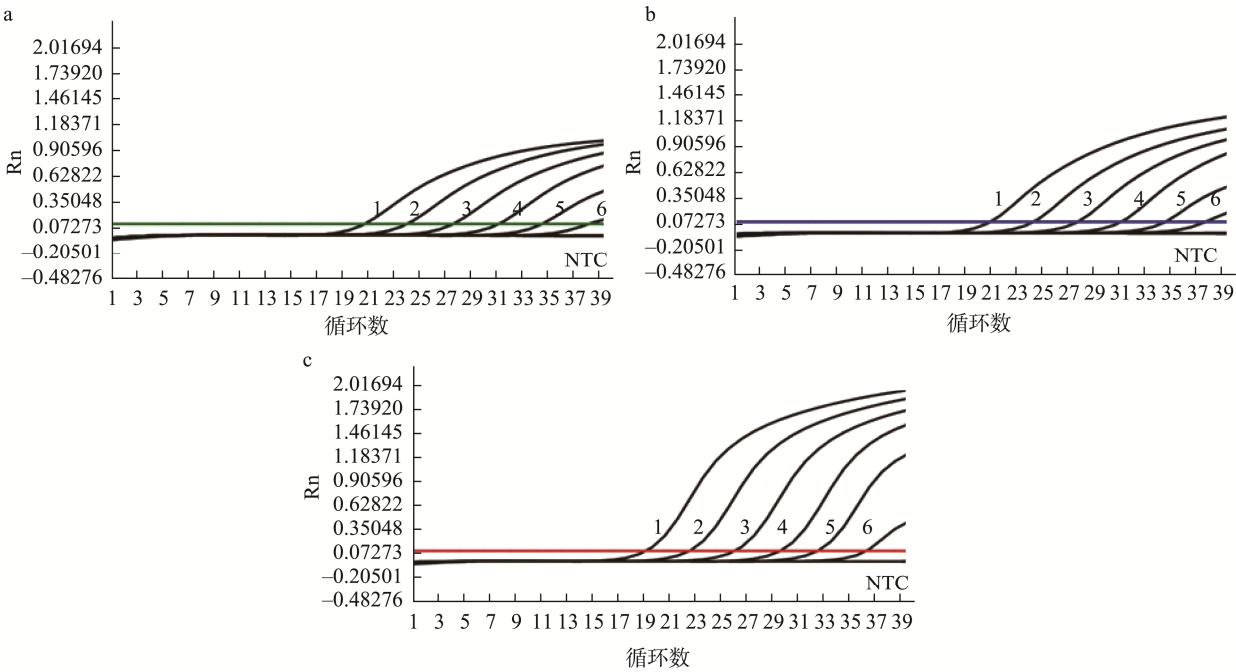
1.4 数据处理

所有统计分析均使用 SPSS 19.0 进行分析，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 灵敏度实验结果

用所建立的方法重复检测 10 倍梯度稀释的肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 (CMCC 44828)菌悬液 3 次，该方法的检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 的灵敏性均为 10² CFU/mL。检测结果如图 1 所示。



注：a 为冻干体系扩增 *eae* 靶标的灵敏性测试；b 为冻干体系扩增 *stx1* 靶标的灵敏性测试；c 为冻干体系扩增 *stx2* 靶标的灵敏性测试。
1~6 分别为浓度 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² CFU/mL；NTC 为阴性对照。

图 1 多重实时 PCR 灵敏性实验结果
Fig.1 Sensitivity test results of the multiplex real-time PCR

2.2 特异性实验结果

用所建立的方法检测质量浓度为 100 ng/mL 的菌株基因组 DNA, 检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因, 所有 STEC 菌株检测 *stx1* 或 *stx2* 基因至少一项为阳性, *eae* 基因结果呈现不同; 所有非 STEC 菌株 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因均呈阴性反应, 检测结果见表 2。

2.3 稳定性实验结果

用置于 25 °C 1 年的反应体系和新冻干的反应体系同时检测不同浓度的大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株

(CMCC 44828) DNA。两种反应体系检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 的结果均一致, 说明反应液置于 25 °C 1 年其性能没有改变, 结果见图 2。

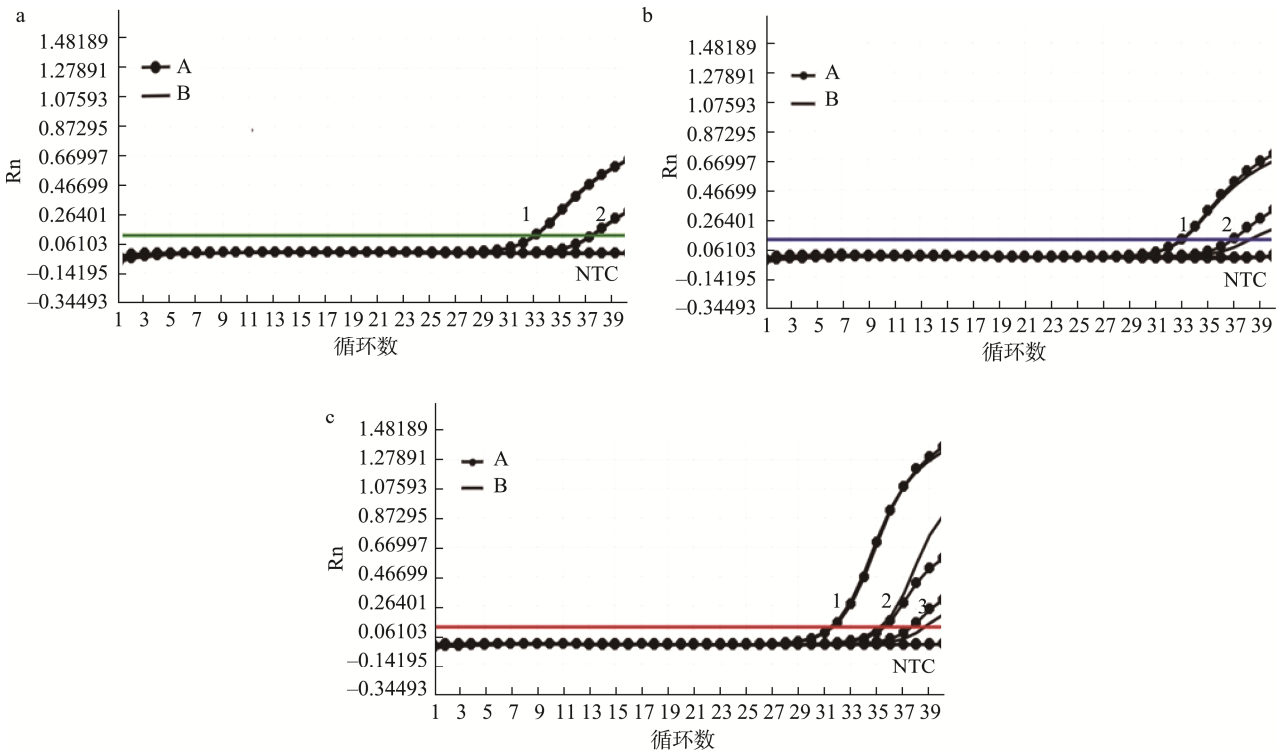
2.4 破坏性实验结果

用置于 55 °C 1 个月的反应体系和新冻干的反应体系同时检测不同浓度的大肠埃希氏菌 O157:H7 标准菌株 (CMCC 44828) DNA。两种反应体系检测 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 的结果均一致, 说明反应液置于 55 °C 1 个月其性能没有改变, 结果见图 3。

表 2 多重实时 PCR 特异性实验结果
Table 2 Specificity test results of the multiplex real-time PCR

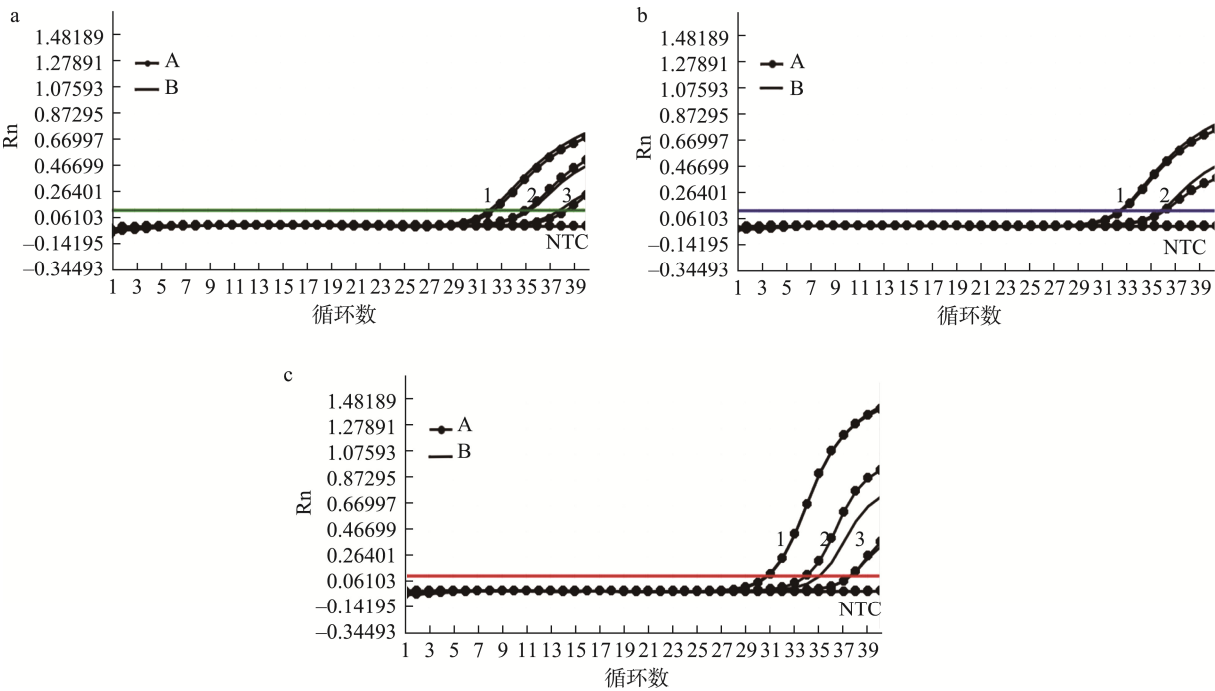
序号	菌株	菌种来源	stx 和 eae 基因检测结果		
			stx1	stx2	eae
1	大肠埃希氏菌 O157: H7 (CMCC 44828)	中国微生物菌种保藏中心	+	+	+
2	大肠埃希氏菌 O157:H7 (CICC21530)	中国工业微生物菌种保藏管理中心	+	+	+
3	大肠埃希氏菌 O103 (GDMCC1.3809)	广东省微生物菌种保藏中心	+	-	+
4	大肠埃希氏菌 O26 (GDMCC1.3807)	广东省微生物菌种保藏中心	+	-	+
5	大肠埃希氏菌 O45 (GDMCC1.3808)	广东省微生物菌种保藏中心	+	+	-
6	大肠埃希氏菌 O121 (GDMCC1.3811)	广东省微生物菌种保藏中心	-	+	+
7	大肠埃希氏菌 O145 (GDMCC1.3812)	广东省微生物菌种保藏中心	+	-	-
8	大肠埃希氏菌 O111 (GDMCC1.3810)	广东省微生物菌种保藏中心	+	-	+
9	双相亚利桑那菌(ATCC 29934)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
10	沙门氏菌(ATCC 35640)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
11	弗氏柠檬酸杆菌(ATCC 43864)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
12	阴沟肠杆菌(ATCC 49141)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
13	阴沟肠杆菌(ATCC 35030)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
14	霍氏肠杆菌(ATCC 700323)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
15	大肠埃希氏菌(ATCC 11775)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
16	大肠埃希氏菌(ATCC 8739)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
17	大肠埃希氏菌(ATCC 35218)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
18	大肠埃希氏菌(ATCC 25922)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
19	普通变形杆菌(ATCC 33420)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
20	奇异变形杆菌(ATCC 25933)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
21	金黄色葡萄球菌(ATCC 33592)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
22	粪肠球菌(ATCC19433)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
23	单核细胞增生李斯特氏菌(ATCC 19111)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
24	副溶血性弧菌(ATCC 17802)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
25	蜡样芽孢杆菌(ATCC 10876)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
26	肺炎链球菌(ATCC 6303)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
27	阪崎克罗诺杆菌(ATCC 25944)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
28	克氏柠檬酸杆菌(ATCC27156)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
29	宋内氏志贺氏菌(ATCC 9290)	美国模式菌种收集中心	-	-	-
30	阴沟肠杆菌(实验室分离株)	东星斑鱼	-	-	-
31	阴沟肠杆菌(实验室分离株)	尖角脆膨化食品	-	-	-
32	鼠伤寒沙门氏菌(实验室分离株)	鸡肉	-	-	-
33	肠炎沙门氏菌(实验室分离株)	猪肉	-	-	-
34	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	蔬菜	-	-	-
35	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	乳制品	-	-	-
36	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	水果	-	-	-
37	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	三文鱼	-	-	-
38	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	冷冻榴莲果肉	-	-	-
39	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	牛肉	-	-	-
40	大肠埃希氏菌(实验室分离株)	生奶	-	-	-

注: +表示检出, -表示未检出。



注: a 为冻干体系扩增 *eae* 靶标的稳定性测试(25 °C 1 年)扩增曲线; b 为冻干体系扩增 *stx1* 靶标的稳定性测试(25 °C 1 年)扩增曲线; c 为冻干体系扩增 *stx2* 靶标的稳定性测试(25 °C 1 年)扩增曲线; A 为冻干体系置于 25 °C 1 年后扩增性能; B 为新鲜配制的冻干体系。1、2、3 代表不同浓度的阳性样品; NTC 表示阴性对照, 图 3 同。

图 2 室温存储稳定性测试
Fig.2 Stability test at room temperature



注: a 为 *eae* 靶标破坏性测试扩增曲线; b 为 *stx1* 靶标破坏性测试扩增曲线; c 为 *stx2* 靶标破坏性测试扩增曲线。A 为冻干后的成品置于 55 °C 1 个月后的扩增曲线, B 为新冻干后配制的反应体系的扩增曲线。

图 3 55 °C 存储破坏性测试
Fig.3 Destructive test at 55 °C storage

3 讨 论

STEC 被列为 9 种常见的食物传播病原体之一, 以 O157:H7、O26、O103、O104、O111、O145、O45 等 7 种最为常见^[15], 即使在高度发达的国家也会导致周期性流行病^[16-18]。STEC 感染主要是通过受污染的食物(主要宿主是牛)导致出血性结肠炎, 并可能留下严重的后遗症, 这与最重要的肠出血性肠杆菌毒力因子之一志贺毒素有关^[16]。编码志贺毒素的基因 *stx* 是 STEC 共有的主要致病因子, 而在菌体黏附过程中起关键作用, 最终导致黏膜上皮损伤的紧密素的编码基因 *eae* 也是 STEC 致病的重要特征之一^[18-20]。本研究引用 ISO13136/TS 以 *stx1*、*stx2* 和 *eae* 为靶序列设计的引物探针, 通过简并碱基创建多重 real-time PCR 反应体系, 既保证了阳性检出率, 又可同时检测 3 种基因, 大幅提升了检测效率。

近年来, 对反应时长的关注使 real-time PCR 设备的温度转换成为研究热门。有诸多快速转换 real-time PCR 反应温度的方案被付诸实施, 并取得了优异的效果^[21-26], 这为本研究进一步改进扩增时长提供了新的思路。研究表明, 影响 real-time PCR 扩增时间长短的关键因素是升降温所需要的时间, 如果将升降温所需时间缩短到足够短, real-time PCR 便可以在 10 min 内完成扩增检测^[25-32]。为缩减反应时间, 克服采用分离培养和血清学鉴定方式的传统 STEC 检测方法周期长、操作复杂等难题, 本研究尝试缩短每一步反应时间, 将整体反应时长缩短至 1 h 以内, 不仅大大缩短了 STEC 检测周期, 且操作简便。

经特异性及灵敏度评价, 结果表明本研究所建立的 STEC *stx1*、*stx2* 和 *eae* 基因多重 real-time PCR 检测方法, 灵敏度较高, 可达为 10^2 CFU/mL。对 O157:H7、O26、O103、O104、O111、O145、O45 等 7 种最常见的 STEC 血清型菌株均有特异性扩增, 对其他 32 株非 STEC 病原菌均无扩增信号, 这说明所建立方法具有良好的特异性。

液态 PCR 检测试剂的储存、运输、冻融均会显著影响其检测性能。为解决试剂稳定性、使用便利性问题, 本研究采用原位冻干技术, 将 PCR 反应体系和阳性质控品预先分装冻干在 PCR 管中, 并覆膜封存, 即开即用。经稳定性和破坏性验证, 该冻干体系表现出良好的热稳定性; 将冻干后的试剂在 25 °C 存放 1 年、55 °C 存放 1 个月, 其检测性能均未明显降低。由此可见, 以原位冻干技术改良 PCR 反应体系, 其引物、探针及酶活性并未受到影响, 至少 1 年内的常温运输或储存不会对其检测性能产生明显不利影响。这不仅大大节省了 PCR 试剂的冷链储运成本, 也省却了烦琐的配液步骤, 使操作更为便捷, 显著缩减加样时间, 同时也降低了添加阳性质控时造成污染的可能。

4 结 论

本研究建立了一种快速、简便、易用的 STEC 多重 real-time PCR 检测方法, 将反应体系原位冻干于 PCR 反应孔中, 即开即用。加入 DNA 后, 盖上盖子直接上机检测, 无需繁杂的配液-分液操作。冻干后的反应体系具有良好的特异性、灵敏度, 且反应体系及质控品均具有良好的稳定性, 为 STEC 的快速、精准筛查提供了解决方案, 有利于临床 STEC 致病因子的早期发现, 便于及时制定和调整治疗方案, 并为预防和监控 STEC 感染提供技术支持。

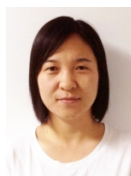
参考文献

- [1] LIU Y, THAKER H, WANG C, et al. Diagnosis and treatment for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated hemolytic uremic syndrome [Z]. 2022.
- [2] YANG G, ZHANG S, HUANG Y, et al. Isolation and characterization of Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods sold at retail markets in China [J]. J Food Prot, 2020, 83(3): 460-466.
- [3] MIR RA, KUDVA IT. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies [J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(1): 1-13.
- [4] MORA A, HERRERA A, LOPEZ C, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain [J]. Int Microbiol, 2011, 14(3): 121-141.
- [5] GILL A, HUSZCZYNSKI G, GAUTHIER M, et al. Evaluation of eight agar media for the isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. J Microbiol Methods, 2014, 96: 6-11.
- [6] BRUSA V, PINEYRO PE, GALLI L, et al. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ground beef using multiple combinations of enrichment broths and selective agars [J]. Foodborne Pathog Dis, 2016, 13(3): 163-170.
- [7] WANG G, CLARK CG, RODGERS FG. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3613-3619.
- [8] TZSCHOPPE M, MARTIN A, BEUTIN L. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 152(1-2): 19-30.
- [9] FRATAMICO PM, WASILENKO JL, GARMAN B, et al. Evaluation of a multiplex real-time PCR method for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef and comparison to the U. S. Department of agriculture food safety and inspection service microbiology laboratory guidebook method [J]. J Food Prot, 2014, 77(2): 180-188.
- [10] NOLL LW, SHRIDHAR PB, DEWSBURY DM, et al. A comparison of culture- and PCR-based methods to detect six major non-O157 serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle feces [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135446.
- [11] PRADO NO, LALLI LA, BLANES L, et al. Lyophilization of molecular biology reactions: A review [J]. Mini Rev Med Chem, 2023, 23(4):

- 480–496.
- [12] AITICHOU M, SALEH S, KYUSUNG P, *et al.* Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents [J]. *J Virol Methods*, 2008, 153(2): 190–195.
- [13] QU S, SHI Q, ZHOU L, *et al.* Ambient stable quantitative PCR reagents for the detection of *Yersinia pestis* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(3): e629.
- [14] YUN Z, ZENG L, HUANG W, *et al.* Detection and categorization of diarrheagenic *Escherichia coli* with auto-microfluidic thin-film chip method [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12926.
- [15] REMFRY SE, AMACHAWADI RG, ATOBATELE M, *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wheat grains: Detection and isolation by polymerase chain reaction and culture methods [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2021, 18(10): 752–760.
- [16] KARCZEWSKA M, WANG AY, NARAJCZYK M, *et al.* Antibacterial activity of t-cinnamaldehyde: An approach to its mechanistic principle towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155845.
- [17] KJELSO C, ALVES DSL, SCHEUTZ F, *et al.* Determinants of sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection in Denmark, 2018–2020: A matched case-control study [J]. *Microorganisms*, 2024, 12(6): 1109.
- [18] JERSE AE, YU J, TALL BD, *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(20): 7839–7843.
- [19] BARBA J, BUSTAMANTE VH, FLORES-VALDEZ MA, *et al.* A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(23): 7918–7930.
- [20] BOERLIN P, MCEWEN SA, BOERLIN-PETZOLD F, *et al.* Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3): 497–503.
- [21] SAKURAI A, NOMURA N, NANBA R, *et al.* Rapid typing of influenza viruses using super high-speed quantitative real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2011, 178(1-2): 75–81.
- [22] ANDREWS WJ, BROWN ED, DELLETT M, *et al.* Rapid quantification of microRNAs in plasma using a fast real-time PCR system [J]. *Biotechniques*, 2015, 58(5): 244–252.
- [23] HUANG S, AN Y, XI B, *et al.* Ultra-fast, sensitive and low-cost real-time PCR system for nucleic acid detection [J]. *Lab Chip*, 2023, 23(11): 2611–2622.
- [24] ROCHE P, NAJJIH M, LEE SS, *et al.* Real time plasmonic qPCR: How fast is ultra-fast? 30 cycles in 54 seconds [J]. *Analyst*, 2017, 142(10): 1746–1755.
- [25] NOUWAIIRI RL, CUNHA LL, TURIELLO R, *et al.* Ultra-rapid real-time microfluidic RT-PCR instrument for nucleic acid analysis [J]. *Lab Chip*, 2022, 22(18): 3424–3435.
- [26] NEUZIL P, ZHANG C, PIPPER J, *et al.* Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(11): e77.
- [27] KWON SH, LEE S, JANG J, *et al.* A point-of-care diagnostic system to influenza viruses using chip-based ultra-fast PCR [J]. *J Med Virol*, 2018, 90(6): 1019–1026.
- [28] SHIN MK, JEON SM, KOO YE. Detection method for genetically modified potato using an ultra-fast PCR system [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32(9): 1–7.
- [29] SHIN MK, JEON SM, KOO YE. Development of a rapid detection method for genetically modified rice using the ultra-fast PCR system [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2022, 31(2): 175–182.
- [30] YANG Z, ZHANG J, TONG X, *et al.* Simulation of rapid thermal cycle for ultra-fast PCR [Z]. 2022.
- [31] XI B, HUANG S, AN Y, *et al.* Sophisticated and precise: Design and implementation of a real-time optical detection system for ultra-fast PCR [J]. *RSC Adv*, 2023, 13(29): 19770–19781.
- [32] HONG Y, KIM JJ, YU YC, *et al.* Ultra-fast PCR method for the distinguishing between *Miichthys miiuy* and *Sciaenops ocellatus* [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021, 30(9): 1225–1231.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



赵 芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 5021665571@163.com



吕敬章, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: jz_lu@yahoo.com.cn