DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250724003
引用格式: 张平, 陆英. 毒力基因表达差异的致泻大肠埃希氏菌聚合酶链反应检测方法的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 155–160.
ZHANG P, LU Y. Optimization of polymerase chain reaction detection method for diarrheagenic *Escherichia coli* with differences in virulence gene expression [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 155–160. (in Chinese with English abstract).

毒力基因表达差异的致泻大肠埃希氏菌聚合酶链反应检测方法的优化

张 平*, 陆 英
(上海市松江食品药品检验所, 上海 201600)

摘 要: 目的 优化 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》中的致泻大肠埃希氏菌聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测方法。**方法** 选取 9 株致泻大肠埃希氏菌标准菌株, 针对 13 种毒力基因和 1 个管家基因, 采用 PCR 扩增结合琼脂糖凝胶电泳进行检测分析; 电泳染色采用 GelRed 泡染法。**结果** GB 4789.6—2016 中提示为等效基因的 *escV*/*eae* 和 *ipaH*/*invE* 毒力基因在部分标准菌株中存在表达差异; 采用 GelRed 泡染法的琼脂糖凝胶电泳可获得更清晰、特异性更强的电泳图谱。**结论** 建议在使用国家标准方法鉴定致泻大肠埃希氏菌型别时, 应同时靶向 *escV* 和 *eae* 基因、*ipaH* 和 *invE* 基因, 并采用 GelRed 泡染技术, 以提高检测结果的准确性和可靠性。

关键词: 致泻大肠埃希氏菌; 毒力基因; 聚合酶链反应; 凝胶电泳

Optimization of polymerase chain reaction detection method for diarrheagenic *Escherichia coli* with differences in virulence gene expression

ZHANG Ping*, LU Ying
(*Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control*, *Shanghai* 201600, *China*)

ABSTRACT: Objective To optimize the polymerase chain reaction (PCR) detection method for diarrheogenic *Escherichia coli* in GB 4789.6—2016 *National food safety standard-Food microbiological examination-Examination of* diarrheagenic *Escherichia coli*. **Methods** The 9 standard strains of diarrheogenic *Escherichia coli* were selected, and 13 kinds of virulence genes and 1 housekeeper gene were detected by PCR amplification and agarose gel electrophoresis; GelRed bubble staining was used for electrophoretic staining. **Results** The virulence genes of *escV*/*eae* and *ipaH*/*invE*, which were indicated as equivalent genes in GB 4789.6—2016, showed expression differences in some standard strains; a clearer and more specific electrophoretic map was obtained by agarose gel electrophoresis with GelRed staining. **Conclusion** It is recommended that when using the national standard method to identify the types of diarrheagenic *Escherichia coli*, both *escV* and *eae* genes, as well as *ipaH* and *invE* genes, shall be targeted simultaneously, and GelRed bubble staining technology shall be employed to enhance the accuracy and

收稿日期: 2025-07-24
第一作者/*通信作者: 张平(1979—), 女, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品微生物安全检测。E-mail: zhangping791223@163.com

reliability of the detection results.

KEY WORDS: diarrheagenic *Escherichia coli*; virulence gene; polymerase chain reaction amplification; gel electrophoresis

0 引 言

致泻大肠埃希氏菌是大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)中能引起腹泻的致病性亚群，是引起食源性疾病的最重要致病菌之一[1]。根据其携带的毒力基因[2–3]、致病机制[4–5]和流行病学[6–7]特征，通常将其分为 5 种，即产肠毒素大肠埃希氏菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠道致病性大肠埃希氏菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠道侵袭性大肠埃希氏菌(enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、肠道出血性大肠埃希氏菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)和肠道聚集性大肠埃希氏菌(enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)[6]。其中 EHEC 是产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)的主要致病亚群[8]。近年研究发现，全国各地区根据医院提供数据，均有可疑食物病例标本中检出一定比例的致泻大肠埃希氏菌阳性[6,9–10]。致泻大肠埃希氏菌的致病潜力是由其毒力基因决定的，毒力基因共 13 个，包括蛋白分泌物调节基因(*escV*)、紧密素基因(*eae*)、束状菌毛 B 基因(*bfpB*)、志贺毒素I基因(*stx1*)、志贺毒素II基因(*stx2*)、侵袭性质粒调节基因(*invE*)、侵袭性质粒抗原 H 基因(*ipaH*)、热不稳定性肠毒素基因(*lt*)、猪源热稳定性肠毒素基因(*stp*)、人源热稳定性肠毒素基因(*sth*)、集聚热稳定性毒素 A 基因(*astA*)、集聚黏附菌毛调节基因(*aggR*)和肠定植因子基因(*pic*)[11]。

GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》对肉制品及即食果蔬制品中致泻大肠埃希氏菌的限量要求作出了明确规定，指出该致病菌主要污染源包括熟肉制品、蔬菜及水果等食品[12]。目前，致泻大肠埃希氏菌的检测及基因分型技术除 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》(以下简称“国标方法”)采用的普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)结合琼脂糖凝胶电泳的分析方法外，还包括荧光定量 PCR、数字 PCR 等高通量分子检测方法[13–15]。据现行国标方法的相关文献研究，该方法在技术层面仍存在一定局限性[16–18]，PCR 确认实验中未明确阳性对照菌株的来源和编号，不同菌种保藏机构提供的不同型别的致泻大肠埃希氏菌标准菌株在毒力基因表达上不完全一致，且在实际检测中通常仅选用等效基因中的单一基因作为靶标[19–21]，未能全面覆盖所有潜在毒力因子，从而影响阳性质控体系的完整性与检测结果的可靠性。针对上述问题，本研究选取 9 株阳性对照菌株，对其 13 个毒力基因及 1 个管家基因进行了全面的 PCR 检测验证，重点考察了 2 对等效基因在同一标准菌株中的表达特征，旨在通过基于毒力基因的表达差异优化致泻大肠埃希氏菌 PCR 检测方法，建立食品中致泻大肠埃希氏菌分型检测的特征基因引物优选策略，以提升检测方法的准确性与可靠性，研究结果可为现行国家标准的修订提供科学依据，并为实验室检测实践提供规范化指导。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

致泻大肠埃希氏菌 PCR 试剂盒(含 14 种基因引物: *escV*、*eae*、*bfpB*、*stx1*、*stx2*、*invE*、*ipaH*、*lt*、*stp*、*sth*、*astA*、*aggR*、*pic*、*uidA* 和预混液)(上海睿玥实验器材有限公司); Ultra GelRed (10000×)核酸染料、100 bp DNA Ladder 分子量标准品(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 6×Loading Buffer 电泳上样缓冲液[宝日医生物科技(北京)有限公司]; Regular Agarose G-10 琼脂糖[维百奥(北京)生物科技有限公司]; 50×TAE 电泳缓冲液(北京索莱宝科技股份有限公司)。

实验菌株: 9 株供试菌株均来源于中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Industrial Microbial Culture Collection and Management Center, CICC)，分别是肠道致病性大肠埃希氏菌(EPEC CICC 24189/21531/10663)、肠道侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC CICC 24188)、产肠毒素大肠埃希氏菌(ETEC CICC10667/25101)、产志贺毒素大肠埃希氏菌(STEC CICC 10670)、肠道出血性大肠埃希氏菌(EHEC CICC 24187)、肠道集聚性大肠埃希氏菌(EAEC CICC 24186)。

1.2 仪器与设备

PowerPac Basic-GelDoc Go 凝胶电泳成像系统仪(美国 BIORAD 公司); PCRMax AC-1 PCR 仪(美国 Cole-Parmer 仪器公司); 7415NANO 微量核酸蛋白浓度测定仪(英国 Jenway 仪器公司); SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); KS12 生物安全柜仪(美国赛默飞世尔科技公司); BD400(E2)细菌培养箱(德国 BINDER 公司); BA410E 型可视显微镜仪(麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 工作菌株的制备

将购入的 9 支标准菌种冷冻管(0 代)分别加入适量的灭菌水使充分溶解，转移至灭菌胰酪大豆胨肉汤培养基增菌，

36 ℃±1 ℃培养 24 h, 用甘油冷冻保藏作为标准贮备菌株。

1.3.2　DNA 模板制备

分别取 9 株标准菌株胰酪大豆胨肉汤菌液 1 mL 于离心管中, 100 ℃金属浴维持 10 min; 冰浴冷却后, 13000 r/min 离心 3 min, 按 1:10 (*V*:*V*)的比例用灭菌去离子水稀释上清液, 测定核酸浓度, 并用灭菌去离子水调整核酸质量浓度为 10 ng/μL, 取 2 μL 作为 PCR 检测的模板。

1.3.3　反应体系和循环条件

2×PCR 预混液 12.5 μL, 10×上下游引物工作混合液 2.5 μL, 模板 DNA 2 μL, PCR 级水 8 μL, 总体积 25 μL。反应条件: 预变性 94 ℃ 5 min; 变性 94 ℃ 30 s, 复性 63 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环, 72 ℃延伸 5 min。

1.3.4　染料液配制

使用 0.1 mol/L NaCl 溶液稀释 Ultra GelRed 染液至 3×染色液(15 μL 10000×Ultra GelRed 染液加入 50 mL 0.1 mol/L NaCl 溶液中), 室温避光保存, 该染液可重复使用 3 次。

1.3.5　琼脂糖凝胶电泳

用 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 电泳仪设定电压为 100 V/cm, 电泳 50 min, 将凝胶缓慢放入 3×Ultra GelRed 染料的合适容器中浸没, 轻轻摇晃, 室温孵育 30 min。

1.4　数据处理

用 PowerPac Basic-GelDoc Go 成像系统拍照保存, 用 Image Lab 6.1 软件对图像进行编辑。

2　结果与分析

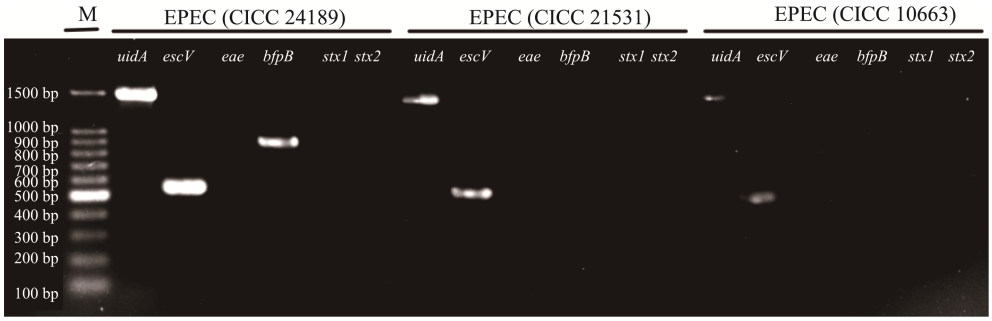
2.1　9 株菌的形态学特征及基因鉴定结果

2.1.1　菌株的形态学特征

9 株供试菌株经 TSB 培养基复苏后, 在 TSA 培养基上的菌落分别呈现乳白色或微黄色, 表面光滑, 半透明, 边缘整齐。取 TSA 培养基上的纯菌落, 经革兰氏染色后于显微镜油镜下观察, 可见菌体呈短杆状, 无芽孢, 且革兰氏染色结果均为阴性。

2.1.2　菌株的特征基因检测结果

5 种标准菌种共 9 株, 分别以管家基因 *uidA* 以及 13 种目标毒力基因, 共 14 种基因引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1~3, 共扩增出 31 个目的条带。根据国标方法中 5 种致泻大肠埃希氏菌特征基因的判定, 9 株菌株均检出 *uidA* 管家基因, 供试菌株 CICC 24189 检出 *escV* 和 *bfpB* 基因, 属于 EPEC; 供试菌株 CICC 10663 和 CICC 21531 均检出 *escV* 基因, 属于 EPEC, 见图 1。供试菌株 CICC 10670 和 CICC 24187 均检出 *escV*、*eae* 和 *stx1* 基因, 属于 STEC/EHEC, 见图 2。供试菌株 CICC 24188 检出 *invE* 和 *ipaH* 基因, 属于 EIEC; 供试菌株 CICC 24186 检出 *astA*、*aggR* 和 *pic* 基因, 属于 EAEC; 供试菌株 CICC 10667 检出 *lt* 和 *sth* 基因, 属于 ETEC; 供试菌株 CICC 25101 检出 *lt*、*stp* 和 *sth* 基因, 属于 ETEC, 见图 3。



注: M. 100 bp DNA Ladder; 下同。

图 1　EPEC 的特征基因电泳图谱

Fig.1　Electrophoretic map of characteristic genes in EPEC

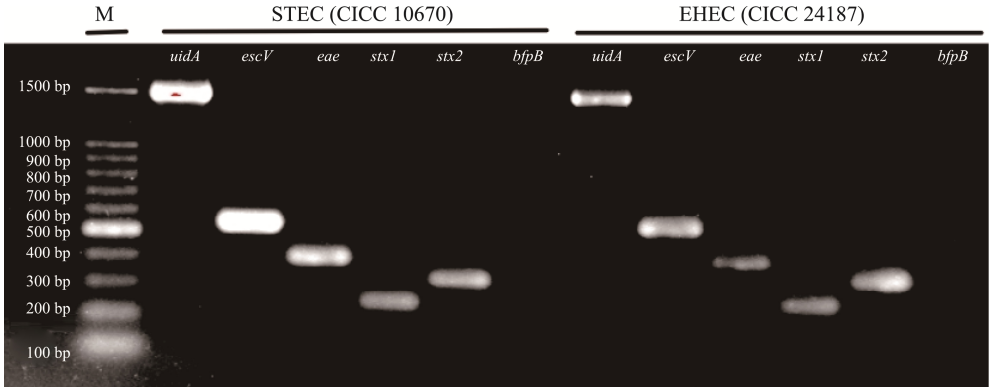


图 2　STEC、EHEC 的特征基因电泳图谱

Fig.2　Electrophoretic map of characteristic genes in STEC and EHEC

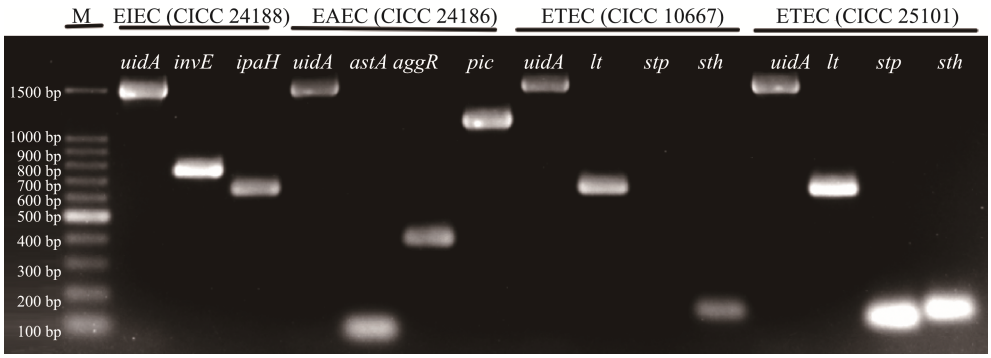


图 3 EIEC、EAEC、ETEC 的特征基因电泳图谱

Fig.3 Electrophoretic map of characteristic genes in EIEC, EAEC and ETEC

2.1.3 9 株菌的鉴定结果

对比国标方法中“表 5 五种致泻大肠埃希氏菌目标条带与型别对照表”, 本研究的 9 株菌的鉴定结果为 5 种致泻大肠埃希氏菌, 见表 1。

2.2 基因表达分析

国标方法规定, *escV* 与 *eae* 基因、*ipaH* 与 *invE* 基因分别作为等效检测靶标, 检测时可选其中任一基因作为判定依据。这种判定标准是基于这些基因在典型致病菌株中通常共存的特性而制定的, 然而, 实际检测中可能出现复杂的情况, 分析如下。

2.2.1 *escV* 与 *eae* 基因

EPEC、STEC/EHEC 的主要致病机制依赖于其诱导的肠黏膜附着/抹平(A/E)损伤, 该表型由位于 LEE 毒力岛的基因簇介导[22−23], 其中 *eae* 基因编码紧密素直接介导细菌与宿主细胞的黏附, 而 *escV* 基因编码III型分泌系统的核心组分, 负责将效应蛋白(如 *Tir*)注入宿主细胞, 二者协同完成 A/E 损伤的形成。尽管 *escV* 和 *eae* 均位于 LEE 岛, 且现行国标方法认为二者在检测中“等效”(可选其一进行检测), 但本研究发现来自 CICC 的 3 株 EPEC 标准菌株(CICC 24189、CICC 21531、CICC 10663)均呈现 *escV* 基因阳性而 *eae* 基因阴性的不一致现象。然而来自 CICC 的 2 株 STEC/EHEC 标准菌株(CICC 10670、CICC 24187)却同时携带了 *escV* 和 *eae* 基因, 与上述 3 株 EPEC 标准菌株呈现不同。EPEC 中 *escV* 与 *eae* 基因的检测不一致性可能与 LEE 毒力岛传代过程中基因丢失或重组导致基因突变有关。由于 EPEC 致病机制的复杂性, 功能性 T3SS(依赖 *escV*)与 Intimin(依赖 *eae*)均为其致病的关键因子, 单独检出某一基因可能无法完全代表菌株的致病潜力。建议在检测方法中同时纳入 *escV* 和 *eae* 基因作为互补靶标, 以提高检测结果的准确性。

表 1 检出基因与国标方法规定的目标条带的比较及结果

Table 1 Comparison and results of detected genes with the target bands in the national standard method

序号	菌株型别	菌株编号	检出特征基因	国标方法规定目标条带的种类组合	结果
1	EPEC	CICC 24189	*uidA*(+)、*escV*(+)、*eae*(−)、*bfpB*(+)、*stx1*(−)、*stx2*(−)	*uidA*(+)、*escV* 或 *eae*(+)、*bfpB*(+/−)、*stx1*(−)、*stx2*(−)	符合国标
2		CICC 10663	*uidA*(+)、*escV*(+)、*eae*(−)、*bfpB*(−)、*stx1*(−)、*stx2*(−)		符合国标
3		CICC 21531	*uidA*(+)、*escV*(+)、*eae*(−)、*bfpB*(−)、*stx1*(−)、*stx2*(−)		符合国标
4	STEC	CICC 10670	*uidA*(+)、*escV*(+)、*eae*(+)、*bfpB*(−)、*stx1*(+)、*stx2*(+)	*uidA*(+)、*escV* 或 *eae*(+/−)、*bfpB*(−)、*stx1*(+)、*stx2*(−)	符合国标
5	EHEC	CICC 24187	*uidA*(+)、*escV*(+)、*eae*(+)、*bfpB*(−)、*stx1*(+)、*stx2*(+)	*uidA*(+)、*escV* 或 *eae*(+/−)、*bfpB*(−)、*stx1*(−)、*stx2*(+) *uidA*(+)、*escV* 或 *eae*(+/−)、*bfpB*(−)、*stx1*(+)、*stx2*(+)	符合国标
6	EIEC	CICC 24188	*uidA*(+)、*invE*(+)、*ipaH*(+)	*uidA*(+)、*invE* 或 *ipaH*(+)	符合国标
7	ETEC	CICC 10667	*uidA*(+)、*lt*(+)、*stp*(−)、*sth*(+)	*uidA*(+)、*lt*、*stp*、*sth* 中 1 条或 1 条以上阳	符合国标
8		CICC 25101	*uidA*(+)、*lt*(+)、*stp*(+)、*sth*(+)		符合国标
9	EAEC	CICC 24186	*uidA*(+)、*astA*(+)、*aggR*(+)、*pic*(+)	*uidA*(+)、*astA*、*aggR*、*pic* 中 1 条 1 条以上阳	符合国标

2.2.2　*ipaH* 与 *invE* 基因

大肠埃希氏菌与志贺菌在基因水平上同源性较高[24]。有研究表明, 部分志贺菌属(如宋内氏志贺菌和鲍氏志贺菌)的 *uidA* 基因检测可能呈现阳性, NBCI GenBank 数据库分析证实该类菌株的染色体上存在 *uidA* 基因序列[25]。另一方面, *ipaH* 基因编码的效应蛋白在上皮细胞渗透和细胞间传播起关键作用。该基因在 EIEC 和志贺菌中高度保守, 且在志贺菌的染色体和质粒上存在多个拷贝[26]。*invE* 基因位于毒力质粒 pINV 上的III型分泌系统(T3SS)调控区, 主要负责启动侵袭相关效应蛋白的分泌。值得注意的是, 金昊嵩等[27]研究发现, 尽管宋内氏志贺菌和鲍氏志贺菌可同时检出 *uidA* 和 *ipaH* 基因阳性, 但 *invE* 基因均为阴性。这一结果表明, 唯有当 *uidA*、*ipaH* 和 *invE* 3 个基因均为阳性时, 才能确证为 EIEC。然而现行国标方法将 *ipaH* 和 *invE* 基因视为等效检测指标, 允许依据任一基因的阳性结果判定 EIEC。本研究中, 典型 EIEC 菌株 CICC 24188 同时携带这两个基因, 但实际检测中可能出现单一基因阳性的情况, 其原因可能包括菌株遗传变异或属于非典型 EIEC 所致。从检测角度分析, *ipaH* 基因在染色体和质粒上的存在多拷贝, 具有较高检出率, 但需注意非致病性大肠埃希菌也可能携带染色体 *ipaH* 基因, 从而导致假阳性结果。相比之下, *invE* 基因表现出更高的特异性, 其存在严格依赖于 pINV 毒力质粒, 但需考虑该质粒丢失可能造成假阴性风险。

2.3　基因优选策略

国标方法规定取生化反应符合大肠埃希氏菌特征的菌落进行 PCR 确认实验, 虽然已经排除了志贺菌属等干扰菌, 但是鉴于本实验中 EPEC 标准菌种的研究以及文献研究[27], 在 EPEC、STEC/EHEC 检测中, *escV* 和 *eae* 基因在致病中的协同作用及实际检测中的非完全共存性, 建议同时靶向 *escV* 和 *eae* 基因, 以及在 EIEC 检测中同时靶向 *ipaH* 和 *invE* 基因, 以避免因单一基因漏检导致的假阴性或者假阳性, 确保结果的准确性。

2.4　琼脂糖凝胶电泳方法的优化

国标方法采用溴化乙锭(ethidium bromide, EB)加入融化的琼脂糖溶液中作为核酸染色剂, 待凝胶凝固后上样进行电泳, 此方法称为胶染法。文献[28–29]指出 EB 虽广泛应用于琼脂糖凝胶中 DNA 染色等领域, 但其作为强诱变剂和致癌物, 对人类健康及生态系统构成严重威胁。研究报道, GelRed 具有高灵敏性、低毒性和良好的性价比, 可作为 EB 替代染料在琼脂糖凝胶电泳中推广应用[30–31]。然而, 花青类大分子染料(如 GelRed)在胶染法中使用时会干扰 DNA 的迁移率, 尤其对大片段 DNA 影响显著, 导致电泳图像出现拖尾模糊现象[30]。为解决此问题, 本研究采用 GelRed 泡染法, 即电泳结束后对凝胶进行染色。此方法消除了染料在 DNA 迁移过程中对图像的干扰, 有效避免了条带扭曲或弥散。最后电泳仪的电压应根据电泳槽的长度调整, 原则上不超过 5 V/cm。本研究使用的是 20 cm 小型电泳槽, 推荐电压不超过 100 V, 以防止设备过载。

3　结　论

本研究基于对 9 株不同型别致泻大肠埃希氏菌标准菌株中 14 种特征基因的 PCR 检测, 验证国标方法的适用性。揭示了部分同型别的致泻大肠埃希氏菌毒力基因表达的差异, 提示在实际检测中需同时靶向多个基因以提升结果可靠性。此外, GelRed 泡染法的应用有效规避了传统 EB 染料的毒性与条带拖尾问题, 显著提高了检测的清晰度与特异性。优化后的检测策略可显著提升食品中致泻大肠埃希氏菌分型检测的准确性与可靠性, 为标准修订提供了实验依据。

同时, 建议后续研究重点构建更完善的阴性对照体系, 深化对非典型菌株毒力基因表达规律的认识, 并探索荧光定量 PCR、数字 PCR 等高通量方法在标准检测中的应用潜力, 以进一步推动国家标准的科学修订与实际应用水平的提升。

参考文献

[1] DESROCHES M, ROYER G, ROCHE D, *et al*. The odyssey of the ancestral escherich strain through culture collections: Anexample of allopatric diversification [J]. mSphere, 2018, 3(1): 553–517.

[2] 徐琦煜, 周武, 周翠, 等. 致泻性大肠埃希菌毒力相关基因的检测和方法学分析[J]. 中国乡村医药, 2016, 23(6): 53–54.
XU QY, ZHOU W, ZHOU C, *et al*. Detection and methodological analysis of virulence related genes in diarrhea causing *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Rural Medicine, 2016, 23(6): 53–54.

[3] 王凯, 刘琪琦. 致泻性大肠杆菌毒力基因及检测方法研究进展[J]. 军事医学, 2013, 37(3): 234–237.
WANG K, LIU QQ. Research progress on virulence genes and detection methods of diarrhea causing *Escherichia coli* [J]. Military Medicine, 2013, 37(3): 234–237.

[4] 遇晓杰, 闫军, 薛成玉, 等. 黑龙江省食品风险监测致泻性大肠埃希氏菌致病性分析[J]. 中国公共卫生管理, 2016, 32(2): 250–252.
YU XJ, YAN J, XUE CY, *et al*. Pathogenicity analysis of diarrhea causing *Escherichia coli* in food risk monitoring in Heilongjiang Province [J]. China Public Health Management, 2016, 32(2): 250–252.

[5] 马金晶, 李凤琴, 白瑶, 等. 养猪场源致泻大肠埃希菌毒力基因和致病型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(2): 127–131.
MA JJ, LI FQ, BAI Y, *et al*. Study on virulence gene and pathogenic type of diarrhoeal *Escherichia coli* from pig farms [J]. China Foods Limited Hygiene Journal, 2021, 33(2): 127–131.

[6] 段胜钢, 齐辰, 陆冬磊, 等. 2018—2020 年上海市致泻大肠埃希氏菌感染的流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 773–779.
DUAN SG, QI C, LU DL, *et al*. Analysis of epidemiological characteristics of diarrhoeal *Escherichia coli* infection in Shanghai from 2018 to 2020 [J]. China Foods Limited Hygiene Journal, 2022, 34(4): 773–779.

[7] 徐云龙, 陈燕, 李明强. 杭州市余杭区致泻性大肠埃希菌分子流行病学研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(13): 1644–1647.
XU YL, CHEN Y, LI MQ. Molecular epidemiological study on diarrhoeal *Escherichia coli* in Yuhang District, Hangzhou City [J]. Chinese Journal of

Health Inspection, 2020, 30(13): 1644–1647.

[8] RICA RDOM, VALENTIN A, MARICARMEN RL, *et al*. A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichiacoli* (STEC): From enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(16): 1–12.

[9] 刘伟, 白婧, 尹可欣, 等. 2015—2019 年北京市海淀区食源性腹泻患者致泻大肠埃希氏菌型别分布和耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(6): 188–191.
LIU W, BAI J, YI KX, *et al*. Type distribution and drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in patients with foodborne diarrhea in Haidian District, Beijing, 2015—2019 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(6): 188–191.

[10] 张燕飞, 田晓伟, 郭邦成, 等. 2016—2021 年宁夏致泻大肠埃希氏菌分布规律及耐药特征分析[J]. 疾病预防控制通报, 2022, 37(6): 62–65, 69.
ZHANG YF, TIAN XW, GUO BC, *et al*. Distribution pattern and drug resistance characteristics of *Escherichia coli* causing diarrhea in Ningxia from 2016 to 2021 [J]. Disease Prevention and Control Notification, 2022, 37(6): 62–65, 69.

[11] 佟盼盼, 黄顺敏, 王芋丹, 等. 新疆地区腹泻仔猪源大肠杆菌的分群、血清型鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(1): 414–420.
TONG PP, HUANG SM, WANG YD, *et al*. Identification of population, serotype and drug resistance of *Escherichia coli* from piglets with diarrhea in Xinjiang [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2013, 54(1): 414–420.

[12] 库文娟, 程强, 王洁. 致泻性大肠埃希氏菌检验操作要点及质量控制探究[J]. 现代食品, 2022, 28(19): 23–25.
KU WJ, CHENG Q, WANG J. Examination of diarrheogenic *Escherichia coli* and quality control research [J]. Modern Food, 2022, 28(19): 23–25.

[13] 李芮, 黄艳梅, 童晓钰, 等. 实时荧光环介导等温扩增快速分型致泻大肠埃希氏菌方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(6): 233–240.
LI R, HUANG YM, TONG XY, *et al*. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method for rapid subtyping of diarrheagenie *Escherichia coli* [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(6): 233–240.

[14] 张雪, 马丽侠, 叶德萍, 等. 即食果蔬制品中致泻大肠埃希氏菌检测微滴数字 PCR 系统的建立[J]. 食品工业科技, 2025, 46(21): 357–365.
ZHANG X, MA LX, YE DP, *et al*. Establishment of a droplet digital PCR system for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in ready-to-eat fruit and vegetable products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(21): 357–365.

[15] 魏咏新, 张西萌, 李二鹏, 等. 食品中致泻大肠埃希氏菌多重实时荧光 PCR 检测方法的建立与验证[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(S2): 89–100.
WEI YX, ZHANG XM, LI ERP, *et al*. Establishment and validation of multiplex real-time fluorescent PCR method for detection of diarrheal *Escherichia coli* in food [J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(S2): 89–100.

[16] 胡海燕, 崔清荣, 罗赛飞, 等. 食品中致泻性大肠埃希菌 PCR 确认试验检测的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(2): 169–171.
HU HY, CUI QR, LUO SF, *et al*. Discussion of PCR confirmation test for *diarrheogenic Escherichia coli* in food [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2023, 33(2): 169–171.

[17] 张彩文, 李金霞, 陈怡文, 等. 致泻大肠埃希氏菌检验用标准菌株的研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 68–73.
ZHANG CW, LI JX, CHEN YW, *et al*. Study of standard strain for testing diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 68–73.

[18] 赵琳娜, 王学硕, 刘娜, 等. 食品检测用肠道侵袭性大肠埃希氏菌标准物质的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 807–814.
ZHAO LN, WANG XS, LIU N, *et al*. Preparation of enteroinvasive *Escherichia coli* reference materials for food analysis [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(6): 807–814.

[19] 许程, 夏辉, 杨雪梅, 等. 食品检测用致泻大肠埃希氏菌标准菌株的研究[J]. 现代食品, 2022, 28(19): 168–170.
XU C, XIA H, YANG XM, *et al*. Study on the standard strain of diarrheagenic *Escherichia coli* for food detection [J]. Modern Food, 2022, 28(19): 168–170.

[20] 谭波, 黄坤宁. 基于多重 PCR 检测食品中致泻大肠埃希氏菌[J]. 食品安全导刊, 2023(8): 78–80, 84.
TAN B, HUANG KN. Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in food based on multiplex PCR [J]. China Food Safety Magazine, 2023(8): 78–80, 84.

[21] 张明明, 梁美丹, 黄志深, 等. 6 类致泻大肠埃希氏菌多重 PCR 检测体系的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4667–4672.
ZHANG MM, LIANG MD, HUANG ZS, *et al*. Establishment of multiplex PCR detection method for 6 strains of diarrheagenic *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(14): 4667–4672.

[22] 孙晖, 赵爱兰, 白向宁, 等. 不同来源肠致病性大肠杆菌(EPEC)分离株 *eae* 基因分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(7): 773–775, 772.
SUN H, ZHAO AIL, BAI XN, *et al*. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human beings and different animal species [J]. Practical Preventive Medicine, 2014, 21(7): 773–775, 772.

[23] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990(87): 7839–7843.

[24] BERNASCONI C, VOLPONI G, PICOZZI C, *et al.* Use of the *tna* operon as a new molecular target for *Escherichia coli* detection [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19): 6321–6325.

[25] 胡朝友, 傅春玲, 陆巧荣, 等. TaqMan 探针荧光 PCR 定量检测大肠埃希菌方法研究[J]. 现代预防医学, 2014, 41(6): 1070–1073.
HU CY, FU CL, LU QR, *et al.* Study on the quantitative detection of *Escherichia coli* by TaqMan probe fluorescent PCR [J]. Modern Preventive Medicine, 2014, 41(6): 1070–1073.

[26] MOHEBI S, NAVE HH, JAVADI K, *et al.* Evaluate the distribution of virulence genes and to investigate antibiotic resistance pattern among Shigella species isolated from children with shigellosis in Iran [J]. Gene Reports, 2021(23): 1–6.

[27] 金昊嵩, 赵中开, 胡凤, 等. PCR 法快速鉴定小儿咳喘灵颗粒中大肠埃希菌[J]. 中国药业, 2023, 32(20): 109–112.
JIN HS, ZHAO ZK, HU F, *et al.* Rapid identification of *Escherichia Coli* in Xiaoer Kechuanling granules by PCR method [J]. China Pharmaceuticals, 2023, 32(20): 109–112.

[28] CHANG PH, BINOY S. Mechanistic insights into ethidium bromide removal by palygorskite from contaminated water [J]. Journal of Environmental Management, 2021, 278(Pt.2): 10.

[29] REEMA N, KAKATI N, RADHAKRISHNANAND P, *et al.* Insights on cold atmospheric plasma treatment of ethidium bromide and its binding to protein BSA [J]. Physica Scripta, 2024, 99(9): 11.

[30] 杨萍, 陆嘉伟, 李翠环. 高效安全的核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2022, 41(7): 60–64.
YANG P, LU JW, LI CH. Application of efficient and safe nucleic acid dyes in agarose gel electrophoresis [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2022, 41(7): 60–64.

[31] 余文, 安琳, 陈怡文, 等. 8 种市售核酸染料的细菌回复突变实验[J]. 卫生研究, 2020, 49(6): 938–943, 948.
YU W, AN L, CHEN YW, *et al.* Safety of eight nucleic acid dyeson [J]. Journal of Hygiene Research, 2020, 49(6): 938–943, 948.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)