

# 小肠结肠炎耶尔森氏菌分子生物学检测技术研究进展

钟月明<sup>1,2</sup>, 王涓<sup>1\*</sup>, 丁郁<sup>3</sup>, 吴清平<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 刘鸣<sup>2</sup>, 汪智<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070) (3. 暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东广州 510632)

**摘要:** 小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*, *Y. enterocolitica*) 是一种重要的食源性致病菌, 可以引起人类的耶尔森氏菌病, 该病的典型症状为腹泻、回肠炎和肠系膜淋巴结炎等。由于该菌在特定食品 (如肉与肉制品) 中的检出率较高, 因此对食品安全构成一定的威胁。就现有的检测方法而言, 分离纯化和生理生化鉴定方法耗时且难以检测出复杂食品基质中低浓度的小肠结肠炎耶尔森氏菌。所以, 研发能够快速、准确地检测食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的鉴别方法迫在眉睫。该研究将小肠结肠炎耶尔森氏菌现有的分子生物学检测方法分为两大类: 变温扩增技术和等温扩增技术进行相关研究最新进展的总结, 并对其优缺点和发展方向进行讨论, 以期小肠结肠炎耶尔森氏菌快速检测方法研究提供参考。

**关键词:** 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 食源性致病菌; 分子生物学检测方法

文章编号: 1673-9078(2023)08-319-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1008

## Research Progress of Molecular Biology Detection Technology for *Yersinia enterocolitica*

ZHONG Yueming<sup>1,2</sup>, WANG Juan<sup>1\*</sup>, DING Yu<sup>3</sup>, WU Qingping<sup>2</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, LIU Ming<sup>2</sup>, WANG Zhi<sup>2</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

(3. Department of Food Science and Engineering, Institute of Food Safety and Nutrition, College of Science & Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) is an important food-borne pathogen which can cause human Yersiniosis. The typical symptoms of the disease include diarrhea, ileitis, and mesenteric lymphadenitis. Because of the high detection rate of this microbe in certain foods, such as meat and meat products, it poses a certain threat to food safety. In terms of current detection methods, isolation, purification and biochemical identification methods are time-consuming and difficult to detect *Y. enterocolitica* at low concentrations in complex food matrices. Therefore, it is urgent to develop a rapid and accurate method to detect *Y. enterocolitica* in food. In this paper, the existing molecular biology detection methods for *Y. enterocolitica* are divided into two categories, variable temperature amplification technology and isothermal amplification technology, in order to summarize the most recent relevant research progress. The advantages, disadvantages and development direction are also discussed to provide a reference for the research on the rapid detection method for *Y. enterocolitica*.

引文格式:

钟月明,王涓,丁郁,等.小肠结肠炎耶尔森氏菌分子生物学检测技术研究进展[J].现代食品科技,2023,39(8):319-325

ZHONG Yueming, WANG Juan, DING Yu, et al. Research progress of molecular biology detection technology for *Yersinia enterocolitica* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 319-325

收稿日期: 2022-08-13

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目 (2020B0301030005); 广东特支计划 (2021TQ06N119); 国家自然科学基金项目 (31730070); 广东省重点实验室 (2020B121201009)

作者简介: 钟月明 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌检测, E-mail: 951606017@qq.com

通讯作者: 王涓 (1986-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全检测与监测, E-mail: wangjuan@scau.edu.cn

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*; foodborne pathogens; molecular biology detection methods

小肠结肠炎耶尔森氏菌是一种革兰氏阴性杆菌或球杆菌<sup>[1]</sup>,主要存在于牛奶及奶制品<sup>[2]</sup>、生肉<sup>[3]</sup>、家禽<sup>[4]</sup>、鸡蛋<sup>[5]</sup>、蔬菜和海鲜<sup>[6]</sup>中,具有“嗜冷性”,是在冷藏温度下能生长的少数致病菌之一<sup>[7]</sup>。同时,小肠结肠炎耶尔森氏菌是一种胃肠道病原体,经食物、水感染人类后可导致耶尔森氏菌病。这种致病菌的感染,不仅是导致人胃肠道疾病的因素之一,而且对呼吸系统、心血管系统、骨骼结缔组织等相关疾病的发生和发展也有一定的影响,有时也会导致败血症,甚至死亡<sup>[8]</sup>。2020年,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)和欧洲疾病预防控制中心(European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC)有关耶尔森氏菌的报告指出,该致病菌所引起的耶尔森氏病是仅次于弯曲杆菌和沙门氏菌感染病的第三大最常见的人畜共患性疾病<sup>[9]</sup>。此外,本研究团队对我国食源性致病菌流行和污染的长期监测结果表明,小肠结肠炎耶尔森氏菌在全国多地的零售食品均有检出<sup>[10,11]</sup>,应当引起大家重点关注。

小肠结肠炎耶尔森氏菌按照生化鉴定分为六种生物型,分别是1A、1B、2、3、4和5。除了第一种生物型1A以外,其他五种生物型的菌株均含有携带重要毒力基因的毒力质粒(pYV)。最常见的染色体编码毒力决定簇是*ail*,参与抵抗人类血清杀伤的抗性;*ystA*和*ystB*编码的酸热稳定肠毒素,可能会引起腹泻;*inv*对入侵宿主细胞至关重要<sup>[12]</sup>。另外,基于常规血清型分型,已鉴定出70多种小肠结肠炎耶尔森氏菌的血清型;基于脂多糖可鉴定常见的五种血清型分别是O:1,2、O:3、O:5、O:8、O:9,部分血清型如O:3、O:8、O:9被认为与人类疾病密切相关<sup>[13]</sup>。

目前,小肠结肠炎耶尔森氏菌的现有检测方法主要依赖生化反应,具体检测产品包括生化鉴定管、API鉴定试纸条等。常规检测方法主要是参照食品安全国家标准《食品微生物检验》GB 4789.8-2016进行分离鉴定<sup>[14]</sup>。虽然常规的分离鉴定方法仍然是目前检测该菌的主要方法,但是检测过程耗时费力(大约1周),而且不能准确地确定分离株是否具有致病性。此外,当病原体浓度较低时很难在复杂的样品环境中检测到。为了克服这些局限性,急需开发出更快速、灵敏、特异的分子生物学手段对小肠结肠炎耶尔森氏菌进行检测<sup>[12]</sup>。现在的分子生物学检测方法主要是基于小肠结肠炎耶尔森氏菌分子检测靶标来进行方法构建。已报道的小肠结肠炎耶尔森氏菌核酸检测靶标主要分为两类:一类是基于毒力基因的致病性小肠结肠炎耶尔

森氏菌检测靶标,包括*ail*<sup>[15]</sup>、*ystA*、*ystB*、*inv*<sup>[16]</sup>和*outL*<sup>[17]</sup>;另一类是基于保守基因的小肠结肠炎耶尔森氏菌种检测靶标包括*16S rDNA*<sup>[18]</sup>、*tufA*<sup>[19]</sup>、*foxA*<sup>[20]</sup>、*phop*<sup>[21]</sup>、*gyrB*<sup>[22]</sup>和FR729477 locus<sup>[23]</sup>。

本文将围绕近几年小肠结肠炎耶尔森氏菌基于多种检测靶标的分子生物学检测方法进行综述(图1),旨在为该致病菌即时检验(Point-of-Care Testing, POCT)的后续研究及发展提供理论依据和技术支持。

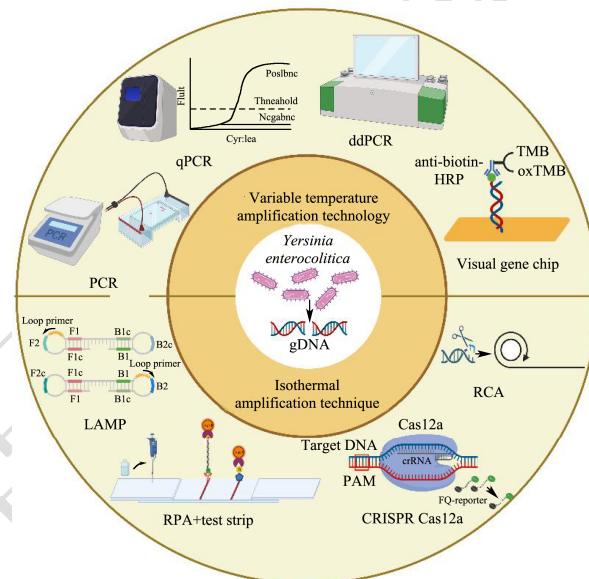


图1 小肠结肠炎耶尔森氏菌分子生物学检测技术的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the molecular biology detection technology of *Y. enterocolitica*

注:上图(由左到右)为变温扩增技术(PCR<sup>[24]</sup>、qPCR<sup>[25]</sup>、ddPCR<sup>[26]</sup>、可视化基因芯片<sup>[27]</sup>);下图(由左到右)为等温扩增技术(LAMP<sup>[28]</sup>、RPA+试纸条<sup>[29]</sup>、CRISPR Cas12a 检测体系<sup>[30]</sup>、RCA<sup>[31]</sup>)。

## 1 变温扩增技术

### 1.1 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是对特定区域DNA片段进行扩增的分子生物学技术<sup>[24]</sup>。它的最显著的特征是能够大规模地复制微量DNA,具有特异性强、灵敏度高、操作简便等特点。郑宇等<sup>[32]</sup>基于小肠结肠炎耶尔森氏菌靶标*foxA*、*ail*、*ystA*、*ystB*建立一种多重检测方法,并成功利用多重PCR方法和所建立的多重PCR方法对145份实际样品进行检测和分析。Bui等<sup>[15]</sup>利用多重PCR方法基于4种检测靶标(*fyuA*、*ail*、*inv*和*virF*)鉴别小肠结肠炎耶尔森氏菌致病性强弱。除鉴别该菌的致病性外,

Rusak 等<sup>[19]</sup>基于靶标 *rfbC* 构建双重 PCR 方法来快速鉴定小肠结肠炎耶尔森氏菌血清型 O:3, 这极大缩短了鉴定血清型的时间。相比于分离纯化和生化鉴定方法, 虽然多重 PCR 方法能提高检测效率, 但是该检测结果需要经过繁琐的电泳分析, 且灵敏度有待进一步提高。

## 1.2 实时荧光 PCR 技术

荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 是利用特定荧光染色或荧光标记技术实时监测 PCR 产物, 通过计算样品模板浓度, 达到定量的目的<sup>[25]</sup>。为了实时监测小肠结肠炎耶尔森氏菌, 国际 ISO 标准 (ISO 10273:2017) 规定了使用实时荧光 PCR 技术用于检测小肠结肠炎耶尔森氏菌<sup>[33]</sup>。Foley 等<sup>[16]</sup>基于靶标 *yadA*、*ystB* 和 *inv* 通过多重 qPCR 熔解曲线分析检测不同生物型的小肠结肠炎耶尔森氏菌, 用于 605 个临床样本检测, 准确率达到 99%。Shi 等<sup>[34]</sup>基于抗 OmpF 抗体-免疫磁珠捕获该菌 (捕获率达到 80%), 结合靶标 *foxA* 建立 qPCR 技术, 能够检测人工污染猪肉样品中的小肠结肠炎耶尔森氏菌, 灵敏度低至 64 CFU/g。Liu 等<sup>[35]</sup>基于多重 qPCR 定量检测包括小肠结肠炎耶尔森氏菌在内的 12 种常见病原体, 结果表明不同病原体之间无交叉反应, 能同时快速检测多个病原菌, 具备高通量检测的潜力。目前基于小肠结肠炎耶尔森氏菌 qPCR 检测大多使用是荧光染色法 (SYBR Green I) 进行检测。该方法可与所有双链 DNA 结合, 因此可能无法辨别出 PCR 产物中存在的引物二聚体等, 从而给实验结果带来误差。未来, 研究人员可通过小肠结肠炎耶尔森氏菌检测靶标来设计适用于 qPCR 检测的特异性荧光探针。

## 1.3 数字 PCR

为了提高检测的灵敏度, 数字 PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR) 逐渐进入大众的视线, 该反应体系能够实现核酸的绝对定量分析<sup>[26]</sup>。该技术将单个 DNA 分子分布到孤立的反应中, 扩增后可以检测和分析带有荧光信号的产物。Cristiano 等<sup>[36]</sup>利用 qPCR 和 ddPCR 用于评估小肠结肠炎耶尔森氏菌在不同温度下孵育 11 d 中污染绿叶蔬菜中的检测率, 通过比较两种方法, 结果只有 ddPCR 可以在以低于 1 log CFU/g 接种的样品中检测到, 说明 ddPCR 灵敏度远远优于其它检测方法。但常规 PCR、qPCR、ddPCR 等检测方法往往需要专业的检测仪器, 因此这些方法通常只用于实验室检测, 不能广泛应用于现场检测。

## 1.4 基于变温扩增的生物传感器

以往报道显示, 结合变温扩增和芯片的检测技术可以实现高通量可视化检测。胡瑞<sup>[27]</sup>将 PCR 反应变性后的单链产物与芯片上的荧光微球探针结合, 利用两束激发光对待测物进行检测, 结合软件分析即可直接获得检测结果, 建立了对小肠结肠炎耶尔森氏菌等四种病原菌 xMAP (Flexible Multi-Analyte Profiling) 液态芯片方法。该检测技术能够对单通道多反应同时检测, 具有多重、重复性好以及检测动态范围宽等优点。赵金毅<sup>[37]</sup>将 PCR 反应变性后的单链产物与芯片表面探针杂交之后, 利用辣根过氧化物酶 (HRP) 催化形成沉淀在芯片表面发生沉积, 通过芯片颜色变化分析检测结果, 建立了包括小肠结肠炎耶尔森氏菌在内的 9 种食源性致病菌的可视化基因芯片检测技术。该技术具有准确、高通量等特点。为了解决芯片制备成本高且检测过程繁琐等缺点, 张宏伟等<sup>[38]</sup>利用 PCR 结合试纸条建立了一种快速检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测方法。结果表明该检测体系灵敏度高 (检测限为  $10^0$  CFU/mL), 准确快速, 可用于样品快筛。目前针对小肠结肠炎耶尔森氏菌的芯片制备技术尚未成熟, 所以该检测技术未能广泛推广使用。

## 2 等温扩增技术

### 2.1 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 是一种灵敏度高、反应速度快、不受热循环仪器限制的恒温扩增技术<sup>[39,40]</sup>。该技术能针对靶基因的六个区域设计四种特异引物, 在链置换 DNA 聚合酶的作用下, 仅需 15~60 min 就能够将核酸的扩增量达到原来的  $10^9\sim 10^{10}$  倍<sup>[41,42]</sup>。Ranjbar 等<sup>[23]</sup>基于新挖掘检测靶标 FR729477 locus 建立 LAMP 检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的方法, 结果表明该方法比 PCR 的灵敏度高 10 倍。徐云明等<sup>[43]</sup>基于靶标 *outL* 建立一种能够肉眼可视化检测小肠结肠炎耶尔森氏菌的 LAMP 方法。该检测体系只需增菌 1 h, 加标鸡肉检测限为 700 CFU/g。虽然 LAMP 具有很多优点, 但该反应体系的配制对环境条件要求严格, 需要在无菌的超净台中操作, 否则会因为气溶胶而导致假阳性, 而且 LAMP 无法进行多重扩增, 这限制了其在高通量检测方面的发展<sup>[28]</sup>。

## 2.2 滚环扩增技术

滚环扩增 (Rolling Circle Amplification, RCA) 是在 DNA 聚合酶的催化下使用环状模板生成数千个重复的 DNA 序列<sup>[44,45]</sup>。与变温核酸扩增相比, RCA 更适合现场检测<sup>[46]</sup>。张建等<sup>[31]</sup>用核酸外切酶 I 将小肠结肠炎耶尔森氏菌靶标 16S rDNA 序列由双链变成单链, 然后锁式探针与模板单链结合延伸一周后, 再进行下一个延伸。第二个延伸过程是在 phi29 聚合酶链置换条件下进行的, 从模板上将扩增产物置换出来, 用于扩增信号的检测, 进而实现对小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测。该方法在稳定性、特异性和灵敏度方面具有明显优势, 具有很高的应用价值。与此同时, RCA 也具有一定的应用弊端, 即成本高、对实验人员的技术门槛要求高等<sup>[47]</sup>。主要原因是: ①锁式探针直接合成成本以及 phi29 聚合酶成本高; ②在实验的过程中, 实验人员需要优化反应体系, 以减少未成环锁式探针和未结合探针的模板所产生的背景信号对实验结果的影响。

## 2.3 重组酶聚合酶扩增

重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 主要有 3 种酶参与反应。1、重组酶: 其主要作用是结合引物并对同源区域进行识别; 2、单链结合蛋白: 它能够结合置换出来的单链, 以便于后续反应; 3、DNA 聚合酶: 该酶能够在常温下催化延伸反应, 以生成新的 DNA 链<sup>[48,49]</sup>。目前, 该扩增技术所需的引物以及对应的反应条件, 还需要实验人员进行摸索、设计和优化, 适用于 RPA 技术的相关软件还有待于进一步开发。刘婧文等<sup>[49]</sup>建立的实时荧光 RPA 技术, 具有成本低, 操作简单, 不受人员、仪器、场地等人为和环境因素限制的特点, 为致病小

结肠炎耶尔森氏菌快速初筛定性检测提供了数据支持和新的方向<sup>[50]</sup>。郑宇<sup>[29]</sup>将 SYBR Green I 和 RPA 结合荧光可视化检测小肠结肠炎耶尔森氏菌, 构建了基于量子点检测探针的 RPA 结合试纸条检测体系, 将该菌在实际样品中的检测也实现体温触发和快速可视化。此外, 核酸等温扩增方法可通过结合不同方法实现信号放大, Xiao 等<sup>[51]</sup>建立基于靶标 *ail* 的 CRISPR/Cas12a-RPA 体系来检测生猪肉中的小肠结肠炎耶尔森氏菌, 检测限为 1.7 CFU/mL, 比 qPCR 灵敏 100 倍。本实验室此前成功开发了基于 CRISPR/Cas12a 的检测体系用于单增李斯特菌的检测<sup>[52,53]</sup>。

## 3 总结与展望

目前已报道的可用于小肠结肠炎耶尔森氏菌检测的方法有传统培养法, 免疫学和分子生物学方法。传统培养法 (例如使用 CIN-1 和改良 Y 琼脂培养基) 对小肠结肠炎耶尔森氏菌进行鉴定, 但这些方法繁琐、耗时、无法快速鉴定菌株是否具有毒性。而免疫学检测方法中所需特异性单克隆抗体制备过程周期长、成本高。因此, 通过使用分子生物学方法来检测小肠结肠炎耶尔森氏菌成为主流。

在分子生物学检测方面, 除了 PCR、qPCR 和 LAMP 检测方法较为成熟外, ddPCR、RPA、RCA、变温扩增的生物传感器等方法都有很好的应用前景, 尤其是针对小肠结肠炎耶尔森氏菌的快速便携式检测, 已开发的检测方法汇总于表 1。值得注意的是目前该菌的检测和鉴定方法往往侧重于检测已知的致病菌株, 而往往忽略生物型 1A 菌株。然而, 生物型 1A 的菌株还存有潜在的未知风险, 在检测过程中故意忽视可能导致调查或诊断结果出现偏差。因此建立基于特异性分子靶标的小肠结肠炎耶尔森氏菌快速检测方法是十分必要的。

表 1 总结和比较小肠结肠炎耶尔森氏菌的分子生物学检测方法

Table 1 Summary and comparison of molecular bioassays for *Y. enterocolitica*

检测方法	靶标	检测限	检测时长/h	其他优点	其他缺点	文献
PCR	<i>inv</i> , <i>ail</i> , <i>fyuA</i>	10 <sup>1</sup> CFU/mL	4~5	检测方法成熟	检测灵敏度有待提高, 昂贵的热循环仪器	[15]
	<i>tufA</i> , <i>rfbC</i>	1.43×10 <sup>2</sup> CFU/mL	4~5			[19]
IMBs-qPCR	<i>foxA</i>	64 CFU/mL	2~3	无核酸提取步骤	检测成本高	[34]
LAMP	FR729477 locus	65 CFU/mL	2.5	扩增效率高	引物设计复杂, 假阳性高	[23]
	<i>outL</i>	7×10 <sup>2</sup> CFU/mL	2.5			[43]
RCA	16S rDNA	1.7×10 <sup>2</sup> CFU/mL	1.5	特异性高	锁式探针设计复杂, 合成成本高	[31]
qRPA	<i>ail</i>	3 CFU/25 g	1.2		探针设计复杂	[49]
RPA-SYBR Green I	<i>ail</i>	10 <sup>1</sup> CFU/μL	1.5	原理简单, 性价比高	模板不宜太长	[29]
xMAP Liquid Chip	<i>ail</i>	3.0×10 <sup>1</sup> CFU/mL	>1.5	高通量检测	检测过程繁琐, 检测成本高	[27]
Visual gene chip	23S rDNA	8.5×10 <sup>1</sup> CFU/mL	>1.5			[37]
RAA+试纸条	<i>ail</i>	9.6×10 <sup>3</sup> CFU/mL	~1	检测过程简单	检测灵敏度有待提高	[29]

此外,开发针对小肠结肠炎耶尔森氏菌血清型的检测方法也尤为重要。目前常用的血清型分型方法是玻片凝集法。然而,该方法需要5~8 d才能确定血清型,极大地阻碍了其应用。为了克服传统诊断血清型方法的不足,基于分子生物学检测方法已被开发,但仍存在一定局限性。例如血清型靶标覆盖率不高,因此还有更多小肠结肠炎耶尔森氏菌的血清型靶标有待开发。

针对小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测已有较多检测方法的报道,但现有检测方法存在普遍问题有:检测设备昂贵、灵敏度不足、样品预处理复杂等。这些方法的不足就导致对大量且复杂的食品样品难以有效监测。因此现有小肠结肠炎耶尔森氏菌检出率可能被低估。

未来小肠结肠炎耶尔森氏菌分子生物学检测的研究重点是种靶标和血清型靶标挖掘、新检测方法的开发验证。以期克服上述不足的同时为相关食品生产、零售和监管提供可切实可行的技术基础。

## 参考文献

- [1] Mancini M E, Beverelli M, Donatiello A, et al. Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from foods in Apulia and Basilicata regions (Italy) by conventional and modern methods [J]. PloS One, 2022, 17(7): e0268706.
- [2] Gruber J F, Morris S, Warren K A, et al. *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with pasteurized milk [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(7): 448-454.
- [3] Zdolec N, KIŠ M, Jankuloski D, et al. Prevalence and persistence of multidrug-resistant *Yersinia enterocolitica*4/O:3 in tonsils of slaughter pigs from different housing systems in Croatia [J]. Foods, 2022, 11(10): 1459.
- [4] Hassanzadeh P, Ghasemzadeh Limoe E, Nourigharajalar S. Molecular detection, biotyping and serotyping of *Yersinia enterocolitica* isolated from chicken livers in Tabriz [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2022, 83: 101777.
- [5] Pohjola L, Nykäsenoja S, Kivistö R, et al. Zoonotic public health hazards in backyard chickens [J]. Zoonoses and Public Health, 2016, 63(5): 420-430.
- [6] Kiani P, Bakhshi B, Soltan-dallal M M, et al. Heterogeneity of highly susceptible *Yersinia enterocolitica* isolates of clinical and environmental origin: A 5-year survey from Iran (2011-2016) [J]. Microbial Drug Resistance, 2020, 26(1): 46-53.
- [7] Zhang Y, On S L W. Cold enrichment methods for the detection of foodborne yersiniosis: friend or foe? [J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2022, 11(2): 278.
- [8] Leon-velarde C G, Jun J W, Skurnik M. *Yersinia* phages and food safety [J]. Viruses, 2019, 11(12): 1105.
- [9] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European union one health 2020 zoonoses report [J] EFSA Journal 2021, 19(2): 6406, 286 pp.
- [10] Wang J, Liu M, Wang H, et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from retail food samples in China [J]. LWT, 2021, 150: 111876.
- [11] 胡惠娟,吴清平,张菊梅,等.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染调查和ERIC-PCR分型研究[J].现代食品科技,2014,30(6):294-300.
- [12] Gupta V, Gulati P, Bhagat N, et al. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015, 34(4): 641-650.
- [13] Rivas L, Strydom H, Paine S, et al. Yersiniosis in New Zealand [J]. Pathogens, 2021, 10(2): 191.
- [14] National Health Commission of the People's Republic of China. GB 4789.8-2016 National Food Safety Standard Food Microbiological Examination *Yersinia enterocolitica* (English Version) [M]. National Health Commission of the People's Republic of China, 2017.
- [15] Bui T H, Ikeuchi S, O'Brien Y S, et al. Multiplex PCR method for differentiating highly pathogenic *Yersinia enterocolitica* and low pathogenic *Yersinia enterocolitica*, and *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2021, 83(12): 1982-1987.
- [16] Foley D A, Tan C E, Donaldson A, et al. The design, validation and clinical verification of an in-house qualitative PCR to detect *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in faeces [J]. Pathology, 2019, 51(7): 733-736.
- [17] Xu Y M, Liu X L, Ma J, et al. Simple, specific, sensitive and rapid loop-mediated method for detecting *Yersinia enterocolitica* [J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2014, 45(3): 670-679.
- [18] Myers K M, Gaba J, Al-khalidi S F. Molecular identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from pasteurized whole milk using DNA microarray chip hybridization [J]. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(2): 71-80.
- [19] Alves L, Rusak, Rodrigo, et al. Rapid detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 using a duplex PCR assay [J].

- Journal of Microbiological Methods, 2018, 154: 107-111.
- [20] Huang Y, Wang X, Cui Z, et al. Possible use of *ail* and *foxA* polymorphisms for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* [J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 211.
- [21] Li Y, Jiang M, Liu W, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targets to the *phoP* gene for detection of *Yersinia enterocolitica* [J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(2): 68-71.
- [22] Gao H, Lei Z, Jia J, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(2): 198-201.
- [23] Ranjbar R, Afshar D. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Yersinia enterocolitica* via targeting a conserved locus [J]. Iranian Journal of Microbiology, 2015, 7(4): 185-190.
- [24] Green M R, Sambrook J. Polymerase chain reaction [J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2019, 2019(6): 436-456.
- [25] Zhu H, Zhang H, Xu Y, et al. PCR past, present and future [J]. BioTechniques, 2020, 69(4): 317-325.
- [26] 卢海强,焦新雅,吴思源,等.数字 PCR 在食源性致病菌检测中的应用进展[J].生物技术进展,2021,11(3):260-268.
- [27] 胡瑞.四种病原菌的 xMAP 液态芯片多重快速检测技术的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2008.
- [28] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10(8): 1931.
- [29] 郑宇.牛羊小肠结肠炎耶尔森氏菌流行病学调查及其检测方法的建立[D].长春:吉林大学,2021.
- [30] Li Y, Li S, Wang J, et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing [J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(7): 730-43.
- [31] 张健.利用滚环扩增技术检测食源性致病微生物的研究与应用[D].青岛:中国海洋大学,2013.
- [32] 郑宇,赵强,李焱笑,等.鉴定小肠结肠炎耶尔森氏菌及其毒力基因的多重 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医学,2020, 50(10): 1249-1256.
- [33] Hallanvuo S, Herranen M, Jaakkonen A, et al. Validation of EN ISO method 10273-Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 288: 66-74.
- [34] Shi J, Chi H, Cao A, et al. Development of IMBs-qPCR detection method for *Yersinia enterocolitica* based on the *foxA* gene [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(7): 4653-4662.
- [35] Liu Y, Cao Y, Wang T, et al. Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by taqman real-time PCR using a single set of reaction conditions [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 222.
- [36] Cristiano D, Peruzzy M F, Apont E M, et al. Comparison of droplet digital PCR vs real-time PCR for *Yersinia enterocolitica* detection in vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 354: 109321.
- [37] 赵金毅.食品中常见致病菌的可视芯片检测技术研究[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [38] 张宏伟,莎日娜,郑文杰,等.核酸试纸条法检测食品中小肠结肠炎耶尔森菌[J].食品研究与开发,2018,39(24):119-123.
- [39] Wong Y P, Othman S, Lau Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 626-643.
- [40] Garg N, Ahmad F J, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens [J]. Current Research in Microbial Sciences, 2022, 3: 100120.
- [41] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- [42] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(1): 13-17.
- [43] 徐云明,朱孟玲,杨剑波,等.小肠结肠炎耶尔森氏菌可视化 LAMP 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2021,51(3):281-288.
- [44] Xu L, Duan J, Chen J, et al. Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies - A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1148: 238187.
- [45] Soares R R G, Madaboosi N, Nilsson M. Rolling circle amplification in integrated microsystems: An uncut gem toward massively multiplexed pathogen diagnostics and genotyping [J]. Accounts of Chemical Research, 2021, 54(21): 3979-3990.
- [46] Gao Y P, Huang K J, Wang F T, et al. Recent advances in biological detection with rolling circle amplification: design strategy, biosensing mechanism, and practical applications [J]. The Analyst, 2022, 147(55): 3396-3414.
- [47] Yue S, Li Y, Qiao Z, et al. Rolling circle replication for biosensing, bioimaging, and biomedicine [J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(11): 1160-1172.

- [48] Munawar M A. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology [J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2022, 22(7): 725-737.
- [49] 刘婧文,黄成栋,凌莉,等.致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌实时荧光 RPA 检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(2): 255-262.
- [50] Mota D S, Guimarães J M, Gandarilla A M D, et al. Recombinase polymerase amplification in the molecular diagnosis of microbiological targets and its applications [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2022, 68(6): 383-402.
- [51] Xiao Y, Ren H, Hu P, et al. Ultra-sensitive and rapid detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* based on the CRISPR/Cas12a nucleic acid identification platform [J]. Foods (Basel, Switzerland), 2022, 11(14): 2160.
- [52] Li F, Ye Q, Chen M, et al. Cas12aFDet: A CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c [J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1151: 338248.
- [53] Li F, Ye Q, Chen M, et al. An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 179: 113073.