

LAMP 在阪崎克罗诺杆菌检测中的研究进展

王彦人^{1,2}, 焦敬波^{1,2}, 张钧森^{1,2}, 康青^{1,2}, 李萍^{1,2}, 杜欣军^{*1,2}

(1. 天津科技大学 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457; 2. 天津科技大学 食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)是一类食源性致病菌,可引起新生儿脑膜炎、败血症等疾病。环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)技术是一类新型的恒温核酸扩增技术,具有灵敏度高、耗时短、特异性强、对设备需求低等特点,可与多种检测方法结合应用于食源性致病微生物的检测。作者旨在阐明 LAMP 的基本原理并归纳结合不同检测方法的 LAMP 技术在阪崎克罗诺杆菌快速检测中的研究进展。

关键词: 阪崎克罗诺杆菌;环介导等温扩增;快速检测

中图分类号:TS 201.6 文章编号:1673-1689(2022)02-0001-07 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2022.02.001

Progress of Loop-Mediated Isothermal Amplification in Detection of *Cronobacter sakazakii*

WANG Yanren^{1,2}, JIAO Jingbo^{1,2}, ZHANG Junsen^{1,2}, KANG Qing^{1,2}, LI Ping^{1,2}, DU Xinjun^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Cronobacter sakazakii* is a kind of foodborne pathogenic bacteria, which can cause neonatal meningitis, septicemia and other diseases. Loop-mediated isothermal amplification technique (LAMP) is a new type of isothermal nucleic acid amplification technique with high sensitivity, short time-consuming, high specificity and low equipment requirements. It can be combined with a variety of detection methods for the detection of foodborne pathogenic microorganisms. This paper aims to elucidate the basic principles of LAMP and summarize the progress of LAMP technology combined with different detection methods in the detection of *C. sakazakii*.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), rapid detection

阪崎克罗诺杆菌为克罗诺杆菌属(*Cronobacter*)中最为典型的一类食源性致病菌种,易感染全年龄段人群^[1],致死率高达 40%~80%^[2],见表 1。其感染引发的主要疾病有新生儿脑膜炎、脑脓肿、血痢、败血症以及坏死性小肠结肠炎等^[3-6],同时感染阪崎克

罗杆菌后的幸存婴幼儿还可能伴随有严重的神经系统后遗症^[7]。Urmenyi 和 Franklin^[8]于 1961 年首次报告了两例由阪崎克罗诺杆菌引起的脑膜炎病例,随后全世界相继出现了相关的病例报告。近年来,国内外由该菌引发的食品安全事件仍屡有发生^[9],

收稿日期:2021-01-09

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1603800);天津市自然科学基金项目(18JCZDJC34300)。

*通信作者:杜欣军(1978—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全检测方面的研究。E-mail:xinjundu@163.com

如在 2004 年我国安徽阜阳发生的“大头娃娃”事件中,87 份劣质奶粉样品中有 11 份样品被检出含有阪崎克罗诺杆菌^[9],这也是我国首次从婴儿配方奶粉中分离到该菌株。该菌广泛分布于各类环境,如婴幼儿配方奶粉生产设施、医疗机构和家庭环境等^[1]。目前还尚未确定克罗诺杆菌的宿主和传播途径,但有相关研究指出,克罗诺杆菌能够在婴幼儿配方奶粉等低水分含量的食品中长期存活^[12],因此对于克罗诺杆菌的快速检测是预防相关食品安全事件发生的重要手段。

表 1 克罗诺杆菌属种型及其典型菌株

Table 1 Species types and typical strain in genus *Cronobacter*

种名	典型菌株	中文名称
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	阪崎克罗诺杆菌
<i>Cronobacter malonaticus</i>	CDC-1058-77	丙二酸盐阳性克罗诺杆菌
<i>Cronobacter turicensis</i>	Z3032	苏黎世克罗诺杆菌
<i>Cronobacter universalis</i>	NCTC9529	尤尼沃斯克罗诺杆菌
<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329	穆汀斯克罗诺杆菌
<i>Cronobacter condimenti</i>	LMG26250	康帝蒙提克罗诺杆菌
<i>Cronobacter dublinensis</i>	DES187	都柏林克罗诺杆菌

传统的检测方法如酶联免疫、电镜观察、细胞培养等表现出较大的局限性,如耗时长、重复性差、分辨力低、易表现出假阳性结果等,使用更精准快捷的检测方法是未来食品安全检测的必然需求^[13]。而传统 PCR 和 qPCR 技术虽能够在几小时内对靶标核酸序列进行特异性扩增,但由于 PCR 过程需要变性、退火、延伸等 3 个特定温度步骤的多次循环,故需要精密的控温仪器,不利于实地快速检测和基层实验室操作的推广应用。20 世纪 90 年代以来,无须进行热变性的等温扩增技术开始发展,其中环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 由于具有快速稳定、特异性强以及不依赖复杂反应设备的特点,已经开始被广泛应用到复杂环境病原微生物的检测中。同时, LAMP 技术由于扩增效率高,能够获得更多的扩增产物(扩增子),故其可与各类简便易行的检测方法结合。随着 LAMP 技

术的广泛化,对于其扩增子的检测方法也不再仅仅受限于传统的电泳法或荧光 PCR 法。新型检测方法不仅具有更佳的时效性和便携性,更伴随着可观的应用前景,然而目前国内对于该方面的综述文章较少有系统性的体现。作者以克罗诺杆菌这一常见食源性致病菌作为切入点,着重于对结合了不同检测方法的 LAMP 技术的近年研究进行归纳总结,旨在为后续阪崎克罗诺杆菌的快速检测提供一定的理论参考。

1 LAMP 技术

2000 年,日本荣研化学株式会社 Notomi^[14]等人报道了一种新型的用于核酸高效扩增的环介导等温扩增技术。该项技术主要基于在起始步骤中产生双茎环结构 DNA,并以此作为模版材料展开后续的 LAMP 过程^[15]。目前该技术已被许多国家尤其日本广泛应用于各个领域,同时,基于 LAMP 的试剂盒现已被广泛作为体外诊断的工具。

1.1 技术原理

与传统 PCR 不同, LAMP 通过针对靶基因的 6~8 个不同位点设计了 4~6 条特异引物^[16],依赖于具有链置换能力的 *Bst* DNA 聚合酶,在 65 °C 左右的恒温条件下对靶基因进行扩增,在 1 h 内即可实现 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的核酸扩增。首先在引物设计方面,先确定靶标基因的 6 个特异性位点——F1、F2、F3、B1、B2、B3,以及 2 对特异性位点之间的区域位点(图 1),其中 F1c、F2c 等位点分别与 F1、F2 等区域互补。根据上述位点设计下列引物:由 F2 和 F1c 组成的上游内引物 FIP、由 B2 和 B1c 组成的下游内引物 BIP、由 F3 区和 B3 区分别组成的上游外引物 FOP 和下游外引物 BOP 以及辅助加快循环效率的促环引物(loop-F/R, LF/R)^[16]。

1.2 扩增过程

LAMP 反应可分为茎环合成和循环扩增两个阶段。以上游引物为例,首先 FIP 与靶标基因 F2c 区结合,在链置换酶的作用下向 3' 方向启动延伸的同时解开双链。随即 FOP 与 F3c 区结合,并在新一轮延伸过程中将 FIP 合成的链替换下来,被替换下来的合成链会通过 F1 区与 F1c 区连接而在上游端形成自杂交的环状结构。同样, BIP 和 BOP 则会引发合成链下游端的自杂交环状结构,最终获得两类上下游端均有着自杂交环状结构的双茎环状 DNA 作为

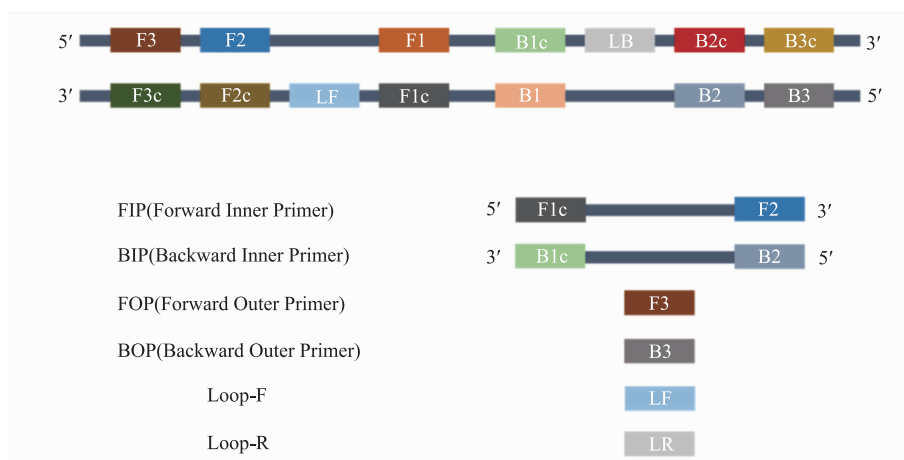


图 1 靶基因特异性位点及 LAMP 体系引物组成

Fig. 1 Target gene-specific loci and primer composition of LAMP system

后续 LAMP 扩增的模板。

两类双茎环状 DNA 具有多个扩增起始位点,如 3' 端的 B1 区、茎环上的 F2c 和 B2 区等。以 FIP 与处于茎环的 F2c 区为例:从 FIP 上的 F2 区向 3' 方向开始链置换合成延伸^[17],形成 2 条新的双茎状 DNA。BIP 进而与其结合,开启新一轮扩增,且产物 DNA 长度增加 1 倍。LAMP 扩增体系中的促环引物 LF 和 LR 则能够分别与茎环结构结合启动新一轮的链置换反应,进而加快反应速率。

LAMP 技术能够以每小时 10^9 扩增子的倍增速度对靶 DNA 进行快速有效地扩增^[14],研究表明,相比于大多数传统 PCR 或实时 PCR 技术,LAMP 技术的 DNA 产量要高近 20 倍^[18]。在临床和食品检测应用中,虽然 LAMP 在复杂食品或饲料中通常表现出较高的稳定性^[19-20],但是也会在一定程度上受到检测抑制剂的干扰^[21-22]。此外,由于 LAMP 的扩增效率远高于传统 PCR,因此其后续对于扩增子的检测方法也具有多样性和时效性^[23]。

2 基于 LAMP 技术的不同平台在克罗诺杆菌快速检测中的应用

LAMP 技术能够快速有效地靶向扩增目的基因,从而获得大量的核酸扩增产物。除传统的琼脂糖凝胶电泳法外,LAMP 能与多种检测方法结合,对扩增产物进行快速准确的检测,如肉眼观察法、实时荧光法、生物发光法、免疫法等,应用于克罗诺杆菌的检测研究见表 2。

2.1 肉眼观察法

在早期研究中,肉眼观察法由于最直观、快速且对仪器设备需求低而被广泛应用于 LAMP 技术中,也是目前阪崎克罗诺杆菌 LAMP 检测的常用方法。由于 LAMP 反应的扩增效率远高于传统 PCR 反应,因此能够通过直接观察来判断 LAMP 产物的生成^[24]。根据是否需要额外加入显色剂,将肉眼观察法分为浊度观察法和显色观察法。浊度观察法不需要额外加入显色剂,是基于 LAMP 反应体系中 DNA 聚合消耗 ATP 所产生的大量焦磷酸盐与体系中的镁离子反应,生成焦磷酸镁的白色沉淀^[25]。显色法则需要额外加入显色剂,如常见的 SYBR Green 荧光染料,染料能够与体系中双链 DNA 的扩增产物结合进而释放出荧光信号,使得阳性反应体系能够在紫外照射下被清楚地观察到。荧光染料检测的灵敏度通常明显高于浊度法。胡等^[26]利用阪崎克罗诺杆菌的 16S~23S rRNA 设计引物,对纯培养物和人工污染婴儿配方奶粉样本进行 LAMP 扩增,通过肉眼观察其反应体系中白色沉淀,检出限分别为 0.101 CFU/mL 和 1.01 CFU/g,相比于常规 PCR 检测技术,该方法显示出较高的灵敏度,为常规 PCR 检测的 1 000 倍。此外,马等^[27]根据阪崎克罗诺杆菌的 16S rRNA 和 *ompA* 基因分别设计 LAMP 引物,对纯培养物进行扩增,并通过显色法对 LAMP 产物进行检测,结果表明 *ompA* 引物对应的检出限为 3 CFU/mL,为 16S rRNA 引物检出限的 1/10。同时 *ompA* 引物的特异性达 100%(9/9),而 16S rRNA 引物的特异性仅为 78%(7/9)。因此较 16S rRNA 基因,根据

ompA 基因设计的 LAMP 引物得到的检测效果可能会更佳。表 2 归纳了不同技术平台基于 LAMP 技术在崎克罗诺杆菌检测中的应用^[28-30]。

表 2 环介导扩增技术检测阪崎克罗诺杆菌

Table 2 Detection of *Cronobacter sakazakii* by loop-mediated amplification technique

序号	靶标基因	检测方法	样本来源	检测限	与 PCR 比较	对内特异性	对外特异性	参考文献
1	16S~23S rRNA	比浊法	纯培养物	0.101 CFU/mL	1 000×	N/A	N/A	[26]
			人工污染婴幼儿配方奶粉	1.01 CFU/g	1 000×	N/A	N/A	
2	16S rRNA	显色法	纯培养物	32 CFU/mL	N/A	100% (1/1)	78% (7/9)	[27]
	<i>ompA</i>			3 CFU/mL	N/A	100% (1/1)	100% (9/9)	
3	16S~23S rRNA	显色法	纯培养物	9.1×10^{-15} g/ μ L	10 000×	100% (3/3)	100% (16/16)	[28]
4	N/A	显色法	纯培养物	20 CFU/mL	N/A	100% (1/1)	100% (5/5)	[29]
			婴幼儿奶粉	N/A(全部合格)	N/A	N/A	N/A	
5	<i>ompA</i>	显色法	纯培养物	10 CFU/mL	10×	100% (8/8)	100% (28/28)	[30]
6	16S rRNA	RT-LAMP	纯培养物	47 CFU/mL	100×	100% (3/3)	100% (19/19)	[31]
7	16S~23S rRNA	RT-LAMP	纯培养物	8×10^{-2} CFU/mL	1 250×	100% (1/1)	100% (7/7)	[32]
8	N/A	3M-MDS	纯培养物	1.79×10^3 CFU/mL	N/A	100% (50/50)	100% (40/40)	[33]
9	N/A	3M-MDS	人工污染乳粉	100 CFU/样品染菌水平	N/A	100% (28/28)	N/A	[34]
			人工污染糊精		N/A	100% (30/30)	N/A	
			人工污染乳清		N/A	100% (36/36)	N/A	
			人工污染乳糖		N/A	100% (22/22)	N/A	
10	Glu-tRNA	3M-MDS	人工污染婴幼儿配方奶粉	$10^2 \sim 10^4$ CFU/g	N/A	N/A	N/A	[36]
11	<i>ompA</i>	酶联免疫吸附法	纯培养物	2 CFU/mL	N/A	100% (5/5)	100% (15/15)	[38]
12	<i>ompA</i>	电化学免疫传感器法	人造合成基因	20 扩增子	N/A	N/A	N/A	[40]
13	CS1&CS31	横向流动试纸条法	纯培养物	4.5 CFU/mL	100×	100% (22/22)	100% (26/26)	[41]
			人工污染牛奶	57 CFU/g	100×	N/A	N/A	
14	ITS	横向流动试纸条法	人工污染婴幼儿配方奶粉	2.8 CFU/g	N/A	100% (20/20)	100%(40/40)	[42]

2.2 实时荧光定量法

RT-LAMP 与 RT-PCR 的原理相同, 均是根据荧光染料与 LAMP 扩增产物结合所产生的荧光信号对扩增进程进行实时定量的检测。陈等^[31]根据阪崎克罗诺杆菌的 16S rRNA 基因序列设计引物, 进行 RT-LAMP, 结果表明其特异性达 100%, 无假阳性影响, 检测限为 47 CFU/mL, 较常规 PCR 灵敏度提高了 100 倍。另外, 石等^[32]也对阪崎克罗诺杆菌纯培养物进行 RT-LAMP, 在保证特异性的同时, 其检测限可达到了 8×10^{-2} CFU/mL, 与同等条件下的常规 PCR 相比, 灵敏度提高了 1 250 倍。

2.3 生物发光法

近年来, 美国 3M 公司推出了一款快速检测致

病菌的便携式分子检测系统 (3MTM Molecular Detection System)。该设备的工作机理主要是通过加入腺苷-5'-磷酸硫酸、ATP 磷酸化酶以及荧光素酶来耦合 LAMP 反应产生的焦磷酸盐进行生物发光来达到自动化检测目的, 能够在 75 min 内输出 1~96 份样本的检测报告, 对大批次高通量样本的检测具有显著优势。谢等^[33]利用 3M-MDS 分别对阪崎克罗诺杆菌的纯培养物以及人工污染食品样本进行了检测, 通过结果分析发现该系统对纯培养物的平均检测限为 1.79×10^3 CFU/mL, 且对于非目标菌株的检测结果均为阴性, 3M-MDS 法的检验结果与传统的生化鉴定国标法 (GB 4789.40-2016) 高度一致, 能够满足乳制品及常见食品样本的快速检测要求。

同样,Patrick 等^[34]于 2019 年对改进后的 3M-MDS 技术进行评估,通过 3M-MDS 和国标上较新发布的平板划线检测标准(ISO 22964:2017)对人为控制污染的 36 组含益生菌婴儿配方奶粉进行检测,结果显示两者的阳性检出率(POD, probability of detection)也没有显著性差异($P>0.05$),说明 3M-MDS 方法在食品检测应用上对传统培养的标准方法具有一定的替代潜力。另外有研究表明,在食品检测时等温扩增检测的灵敏度一般比传统常规 PCR 高 1~3 个数量级^[35]。Kim 等^[36]对人为污染过阪崎克罗诺杆菌的婴儿配方奶粉分别用 3M-MDS 与 RT-PCR 进行检测,通过对比结果发现,3M-MDS 对阪崎克罗诺杆菌的检测限为 $10^2\sim 10^4$ CFU/mL,PCR 中较为灵敏的 RT-PCR 则为 10^2 CFU/mL。虽然现有 3M-MDS 方法较于 RT-PCR 并未对阪崎克罗诺杆菌显示出更高的检测灵敏度,然而在其他食源性致病菌的相关研究中,发现 3M-MDS 法(99.46%)比 RT-PCR (98.74%)有更高的准确率^[37]。

2.4 免疫法

免疫法是一类利用抗原抗体免疫结合反应的高特异性、高灵敏性的检测方法。由于 LAMP 技术的问世时间较短,文献库中对阪崎克罗诺杆菌以 LAMP 免疫法作为检测方法的研究相当有限。

2.4.1 酶联免疫吸附法 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是指将抗原抗体免疫反应和酶(或模拟酶)催化作用相结合的技术。Zhang 等以 Fe_3O_4 磁性纳米粒子作为模拟酶探针,利用双抗夹心法对阪崎克罗诺杆菌的 *ompA* 基因进行检测,特异性达 100%,检测限为 2 CFU/mL,并且该方法对不同浓度模板的结果呈线性响应,适用于定量研究^[38]。同时,该研究还通过单叠氮丙二钠(PMA)排除死菌的干扰,反映出体系内阪崎克罗诺杆菌的存活状态,对实际检测具有较高的潜在应用价值。

2.4.2 电化学免疫传感器法 电化学免疫传感器是将电化学分析与免疫学技术相结合的一类分析器件,通过传感器将分子识别标记物(抗原或抗体)免疫反应产生的化学信号转化为电信号,用于对靶标物质的痕量分析研究^[39]。Guo 等^[40]通过将 LAMP 核酸信号放大、三元催化发夹结构自组装技术(catalytic hairpin assembly, CHA)以及血糖检测仪进行耦合,对人工合成的阪崎克罗诺杆菌 *ompA* 基

因进行检测,最低检测值可低至 20 扩增子(1.32×10^{-18} mol/L),在便携式检测领域具有很大的应用潜力。

2.4.3 横向流动试纸条法 横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)包含检测线和质控线,其中两者分别锚定了特定荧光素的抗体,能够与 LAMP 扩增子中的荧光素结合,实现颜色变化并进行检测判别,较大程度上摆脱了对设备的依赖性。Fu 等^[41]基于 22 个阪崎克罗诺杆菌的全基因组序列比对出的保守核心基因序列(CSK29544_00235 及 CSK29544_03484 基因)设计引物,结合 LAMP-LFD 的方法对 22 株克罗诺杆菌的纯培养物进行检测,灵敏度达 100%,且对其他菌株无假阳性出现,检测限为 4.5 CFU/mL;而对人工污染克罗诺杆菌的牛奶样品的检测限则为 57 CFU/g,比 PCR-LFD 检测限均高出 2 个数量级。Yang 等^[42]基于核糖体 ITS 基因对人为污染阪崎克罗诺杆菌的婴儿配方奶粉进行多重 LAMP-LFD 方法的检测应用,该方法对于 80 类不同奶粉样本特异性达 100%,检测限达到 2.8 CFU/g。

综上,LAMP 能够结合各种后续扩增子检测方法且较好地应用于该致病菌最常见载体——乳制品奶粉中,比传统 PCR 普遍表现出了更高的灵敏度。然而 LAMP 所需的引物设计要求较严苛,6 条引物严格对应靶标基因相应位置,比 PCR 引物复杂程度更大;同时由于 LAMP 带来的大量扩增子产物易在实验室等封闭环境形成气溶胶污染,进而对后续 LAMP 实验带来假阳性或灵敏度的干扰,这些问题需要通过操作人员规范培训及通过加入某些 LAMP 辅助剂进行克服改进。

3 展望

阪崎克罗诺杆菌作为一类常见的食源性致病菌,会对婴幼儿等免疫力低下的人群造成致命威胁,因此建立和改进针对阪崎克罗诺杆菌的快速检测方法和技术极为必要。当今国际社会普遍以 FDA 推荐的传统生理生化鉴定和 PCR 技术作为标准检测手段,相较于以上方法,LAMP 具有时效性好、特异性强、灵敏度高、无须烦琐的温度控制、对设备的依赖性低等优点,且扩增效率远高于传统 PCR。LAMP 同时可以与各种不同扩增子的检测方法相结合,如具有高通量能力的 3M-MDS 法,便携性的 LFD 法等。但是,LAMP 也存在气溶胶干扰严重、引

物设计复杂、不能直接针对活菌检测等不足,未来的研究主要是解决以上问题,降低实验成本,实现现场实时检测。现今随着 LAMP 技术的不断发展完

善和快速检测需求的提高,其必将在阪崎克罗诺杆菌的检测领域占有重要位置,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] HENRY M, FOULADKHAH A. Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings[J]. **Microorganisms**, 2019, 7(3): 77.
- [2] NAZAROWEC-WHITE M, FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*: a review[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1997, 34(2): 103-113.
- [3] MULLANE N R, WHYTE P, WALL P G, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterise and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, 116(1): 73-81.
- [4] 王蕊, 杨鑫焱, 陈思涵, 等. 一种快速检测婴幼儿配方奶粉中阪崎克罗诺杆菌的方法[J]. **食品与发酵工业**, 2018, 44(10): 212-218.
- [5] ALVAREZ-ORDÓÑEZ A, CUMMINS C, DEASY T, et al. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2014, 178: 21-28.
- [6] LEPUSCHITZ S, RUPPITSCH W, PEKARD-AMENITSCH S, et al. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans[J]. **Emerging Infectious Diseases**, 2019, 25(3): 515.
- [7] 裴晓燕, 刘秀梅. 阪崎肠杆菌的生物学性状和健康危害[J]. **中国食品卫生杂志**, 2004, 16(6): 550-555.
- [8] URMENYI A M, FRANKLIN A W. Neonatal death from pigmented coliform infection[J]. **Lancet**, 1961, 1(7172): 313-315.
- [9] 谢爱蓉, 洪程基, 李毅, 等. 温州市售奶粉微生物污染状况调查[J]. **中国卫生检验杂志**, 2016, 26(20): 3013-3015.
- [10] 刘秀梅, 裴晓燕, 郭云昌. 中国安徽阜阳劣质婴儿配方粉中阪崎肠杆菌的污染[J]. **中国食品卫生杂志**, 2005, 17(1): 10-12.
- [11] NORBERG S, STANTON C, ROSS R P, et al. *Cronobacter* spp. in powdered infant formula[J]. **Journal of Food Protection**, 2012, 75(3): 607-620.
- [12] 吴磊磊. 食品微生物快检技术的发展[J]. **现代食品**, 2016(17): 25-27.
- [13] 张吉, 张鹏, 黄振. 食源性病毒及其防控[J]. **农业工程**, 2017, 7(5): 79-82.
- [14] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. **Nucleic Acids Research**, 2000, 28(12): E63.
- [15] NAGAMINE K, WATANABE K, OHTSUKA K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. **Clinical Chemistry**, 2001, 47: 1742-1743.
- [16] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. **Molecular and Cellular Probes**, 2002, 16: 223-229.
- [17] 王雯雯, 张小雨, 马臣杰, 等. 环介导等温扩增技术及其在基因突变筛查中的应用研究[J]. **中国病原生物学杂志**, 2020, 15(4): 492-497.
- [18] MASHOOQ M, KUMAR D, NIRANJAN A K, et al. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: a new tool for DNA quantification[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2016, 126: 24-29.
- [19] FRANCOIS P, TANGOMO M, HIBBS J, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications[J]. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2011, 62: 41-48.
- [20] YANG Q, WANG F, PRINYAWIWATKUL W, et al. Robustness of *Salmonella* loop-mediated isothermal amplification assays for food applications[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2014, 116: 81-88.
- [21] ABU AL-SOUD W, RADSTROM P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000, 38: 4463-4470.
- [22] MACIOROWSKI KG, PILLAI SD, JONES FT, et al. Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds[J]. **Critical Reviews Microbiology**, 2005, 31: 45-53.

- [23] ZHANG X, LOWE SB, GOODING JJ. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. **Biosensors and Bioelectronics**, 2014, 61: 491-499.
- [24] 王静, 许鑫, 王雪雨, 等. 环介导等温扩增技术检测食品安全的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(11): 84-91.
- [25] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 2001, 289: 150-154.
- [26] 胡连霞, 张伟, 张先舟, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 378-382.
- [27] 马寅众, 陈江源, 房国梁, 等. 环介导等温扩增法快速检测阪崎肠杆菌[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 322-325.
- [28] LIU X, FANG J, ZHANG M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) [J]. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 2012, 28(3): 1013-1020.
- [29] 李莉, 陈泽辉. 婴幼儿食品中阪崎克罗诺杆菌的快速检测[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(18): 4-7.
- [30] 范宏英, 吴清平, 刘欢, 等. LAMP 法和 PCR 法快速检测阪崎肠杆菌的比较[J]. 现代预防医学, 2012, 39(2): 383-385.
- [31] 陈文秀. 实时荧光环介导等温扩增技术检测婴幼儿奶粉中阪崎肠杆菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [32] 石伟雄, 王羽, 杨粤, 等. 实时荧光环介导等温扩增技术检测婴儿配方奶粉中阪崎克罗诺杆菌的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2263-2272.
- [33] 谢冠东, 骆海朋, 任秀, 等. 食品中 3MTM 克罗诺杆菌属分子检测系统评价研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3441-3446.
- [34] BIRD P, BENZINGER MJ Jr, BASTIN B, et al. Evaluation of the 3MTM molecular detection assay (MDA) 2-*Cronobacter* for the detection of *Cronobacter* species in select foods and environmental surfaces[J]. **Journal of Association of Official Analytical Collaboration International**, 2019, 102(1): 108-117.
- [35] WANG X Y, DONG J S, LEE M H, et al. Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of arcobacter species[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2014, 52: 557-563.
- [36] KIM JH, OH SW. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for the rapid detection of *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii* artificially inoculated in foods[J]. **Journal of Food Hygiene and Safety**, 2019, 34: 135-139.
- [37] 胡丽君. 沙门氏菌全基因组测序分析及其 DNA 等温扩增检测方法的建立和应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [38] ZHANG L, CHEN Y, CHENG N, et al. Ultrasensitive detection of viable *Enterobacter sakazakii* by a continual cascade nanozyme biosensor[J]. **Analytical Chemistry**, 2017, 89(19): 10194-10200.
- [39] 于娇. 甜瓜细菌性果斑病菌和黄瓜绿斑花叶病毒电化学免疫检测传感器研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [40] GUO L, LU B, DONG Q, et al. One-tube smart genetic testing via coupling isothermal amplification and three-way nucleic acid circuit to glucometers[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2020, 1106: 191-198.
- [41] FU S, QIN X, WANG Z H, et al. Screening of specific nucleic acid targets for *Cronobacter sakazakii* and visual detection by loop-mediated isothermal amplification and lateral flow dipstick method in powdered infant formula [J]. **Journal of Dairy Science**, 2021, 104(5): 5152-5165.
- [42] YANG X Y, JIANG Y J, SONG Y, et al. Point-of-care and visual detection of *Salmonella* spp. and *Cronobacter* spp. by multiplex loop-mediated isothermal amplification label-based lateral flow dipstick in powdered infant formula [J]. **International Dairy Journal**, 2021, 118: 105022.