

## 实验技术与方法

## 铜绿假单胞菌实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增方法建立及应用

王金凤<sup>1,2</sup>, 项佳林<sup>1,2</sup>, 孙晓霞<sup>1,2</sup>, 李睿文<sup>3</sup>, 姜彦芬<sup>1,2</sup>,陈志敏<sup>1,2</sup>, 刘立兵<sup>1,2</sup>, 王建昌<sup>1,2</sup>, 袁万哲<sup>3</sup>

(1. 石家庄海关技术中心, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省检验检疫科学技术研究院, 河北 石家庄 050051; 3. 河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071001)

**摘要:**目的 建立一种快速检测铜绿假单胞菌的实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增(real-time RAA)方法。方法 基于铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因设计特异性引物和 *exo* 探针, 通过灵敏性、特异性和疑似菌株检测评估所建立方法的有效性。结果 Real-time RAA 方法在 39 °C 等温条件下反应 20 min 即可实现对铜绿假单胞菌的有效检测; 特异性强, 仅对铜绿假单胞菌出现特异性扩增; 灵敏性高, 对铜绿假单胞菌基因组 DNA 的检出限为  $3.0 \times 10^3$  fg/反应, 对纯培养铜绿假单胞菌的检出限为  $1.0 \times 10^3$  CFU/反应。应用所建立的 real-time RAA 方法对分离的 36 株疑似铜绿假单胞菌进行检测, 结果均为铜绿假单胞菌, 同 VITEK 2 Compact 生化鉴定方法和 real-time PCR 方法结果一致。结论 本试验所建立的 real-time RAA 方法反应快速、操作简单、可靠性高, 可用于不同来源的铜绿假单胞菌的快速检测和鉴定。

**关键词:**铜绿假单胞菌; *ecfX* 基因; 实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增; 等温扩增

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)05-0524-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.05.010

### Development and evaluation of a real-time recombinase-aid amplification assay for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*

WANG Jinfeng<sup>1,2</sup>, XIANG Jialin<sup>1,2</sup>, SUN Xiaoxia<sup>1,2</sup>, LI Ruiwen<sup>3</sup>,JIANG Yanfen<sup>1,2</sup>, CHEN Zhimin<sup>1,2</sup>, LIU Libing<sup>1,2</sup>, WANG Jianchang<sup>1,2</sup>, YUAN Wanzhe<sup>3</sup>

(1. Technology Center of Shijiazhuang Customs, Hebei Shijiazhuang 050051, China;

2. Hebei Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hebei Shijiazhuang 050051, China; 3. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Hebei Baoding 071001, China)

**Abstract: Objective** To establish a real-time recombinase-aid amplification (RAA) method for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Specific primers and *exo* probes based on *ecfX* gene of *P. aeruginosa* were designed in this study, and the validity of the method was evaluated by sensitivity, specificity and suspected strains detection. **Results** Real-time RAA was performed successfully at 39 °C for 20 min. Only the *P. aeruginosa* strains but not other bacteria were amplified, showing the good specificity. The limit of detection was  $3.0 \times 10^3$  fg genomic DNA per reaction, and  $1.0 \times 10^3$  CFU *P. aeruginosa* pure culture per reaction. The developed real-time RAA was further evaluated on 36 suspected of *P. aeruginosa*, which were identified successfully to be *P. aeruginosa*. The detection result were the same with those of a real-time PCR assay and the VITEK 2 Compact. **Conclusion** The developed real-time RAA assay is a rapid, simple and reliable tool for accurate detection of *P. aeruginosa* of diverse origins.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; *ecfX* gene; real-time recombinase-aid amplification; isothermal amplification

收稿日期: 2020-06-03

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19226636D); 河北省现代农业产业技术体系羊产业创新团队(HBCT2018140204)

作者简介: 王金凤 女 高级兽医师 研究方向为动物疫病病原和食源性致病菌快速检测技术 E-mail: 18630135980@163.com

通信作者: 王建昌 男 高级兽医师 研究方向为动物疫病病原和食源性致病菌快速检测技术 E-mail: jianchangwang1225@126.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种在自然界中广泛存在的, 可感染人和动物的重要条件性致病菌, 可以在一系列不同的环境中定殖, 目前已经从河水、饮用水、食品、土壤、植物和动物中分离到该菌<sup>[1-7]</sup>。铜绿假单胞菌能够引起多种动物的肺炎和奶牛乳房炎, 同时也是医院内感染的主要病原菌之一, 可引起人尿道感染、肺炎等<sup>[3,8-9]</sup>。我国食品安全国家标准明确规定, 铜绿假单胞菌在饮用天然矿泉水和包装饮用水中每 250 mL 不得检

出<sup>[10-11]</sup>。但是,目前包装饮用水中铜绿假单胞菌时有检出,食品中铜绿假单胞菌污染情况也较为严重,成为公共卫生和食品安全的重要隐患<sup>[12-13]</sup>,因此,建立快速、准确的铜绿假单胞菌检测方法对于该菌感染的有效防控具有重要意义。

目前对铜绿假单胞菌的检测方法有多种,其中分离培养及后续的生化鉴定是铜绿假单胞菌检测的“金标准”<sup>[14]</sup>。电化学技术和酶联免疫吸附(ELISA)技术也被用于铜绿假单胞菌的快速检测<sup>[15-16]</sup>。但是,上述方法操作相对复杂,比较费时。目前多种聚合酶链式反应(PCR)方法和等温核酸扩增方法,如环介导等温扩增(LAMP)方法和聚合酶螺旋反应(PSR)技术,也被用于铜绿假单胞菌的快速检测<sup>[17-19]</sup>。PCR方法,尤其是实时荧光PCR(real-time PCR)方法,已经被广泛用于铜绿假单胞菌的检测<sup>[18]</sup>。但是,PCR技术需要精准控温的PCR仪、配套完善的实验室条件和经验丰富的技术人员,从而限制了铜绿假单胞菌PCR方法在基层实验室和现场的应用。作为等温核酸扩增技术,LAMP和PSR方法在操作方便性和设备需求方面具有更加明显优势,但是两种方法反应时间在40~60 min之间<sup>[17,19-20]</sup>。

作为一种等温核酸扩增技术,重组酶介导链替换核酸扩增(recombinase-aid amplification, RAA)方法近年来在人类和动植物病原学、食源性致病菌的分子检测领域得到了快速发展<sup>[21-22]</sup>。一般情况下,RAA能够在35~42℃范围内,等温条件下5~15 min实现对靶基因的有效扩增<sup>[21-22]</sup>。另外,RAA扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳、实时荧光监测分析和试纸条肉眼直接观察等三种方式进行分析。国内外多个研究<sup>[17,20]</sup>表明,RAA技术可能是目前最适用于现场诊断的等温核酸扩增技术。本试验基于铜绿假单胞菌*ecfX*基因设计引物和exo探针,建立快速检测铜绿假单胞菌的real-time RAA方法,并对36株不同来源的疑似铜绿假单胞菌进行检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细菌菌株

2株铜绿假单胞菌标准菌株和25株非铜绿假单胞菌,均保存于本实验室,具体信息见表1。36株分离自不同样品的疑似铜绿假单胞菌,其中25株分离自不同批次的桶装饮用水、4株分离自食品样品、3株分离自患乳房炎奶牛的牛奶、3株分离自病死绵羊肺脏、1株分离自病死狐狸肝脏。

表1 本试验使用的菌株信息

序号	细菌名称	来源
1	铜绿假单胞菌( <i>P. aeruginosa</i> )	ATCC 9027 CICC 21636
2	荧光假单胞菌( <i>P. fluorescens</i> )	CICC 20070
3	恶臭假单胞菌( <i>P. putida</i> )	CICC 10368
4	施氏假单胞菌( <i>P. stutzeri</i> )	CICC 10402
5	绿针假单胞菌( <i>P. chlororaphis</i> )	实验室分离株
6	维罗纳假单胞菌( <i>P. veronii</i> )	实验室分离株
7	革兰假单胞菌( <i>P. graminis</i> )	实验室分离株
8	阴城假单胞菌( <i>P. umsongensis</i> )	实验室分离株
9	副猪嗜血杆菌( <i>Haemophilus parasuis</i> )	CVCC 3894 CVCC 3895
10	传染性胸膜肺炎放线杆菌 ( <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> )	CVCC 259 CVCC 261 CVCC 263
11	$\beta$ 溶血性链球菌( <i>Streptococcus hemolytic-<math>\beta</math></i> )	CMCC10373
12	枯草芽胞杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	ATCC 14579
13	多杀性巴氏杆菌( <i>Pasteurella multocida</i> )	实验室分离株
14	大肠埃希菌( <i>Escherichia coli</i> )	ATCC 43889
15	肺炎克雷伯菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	ATCC 4352
16	曼氏溶血杆菌( <i>Mannheimia haemolytica</i> )	实验室分离株
17	单核细胞增生李斯特菌( <i>Listeria monocytogenes</i> )	ATCC 15313
18	金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	ATCC 6538
19	鼠伤寒沙门菌( <i>Salmonella typhimurium</i> )	CICC 22956
20	产气荚膜梭菌( <i>Clostridium perfringens</i> )	ATCC 13124 CVCC 58 CVCC 81
21	宋内志贺菌( <i>Shigella sonnei</i> )	ATCC 51592

### 1.1.2 主要仪器与试剂

Genie III 等温扩增荧光检测系统(英国 OptiGene),7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI),NanoDrop 2000C 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific)。

荧光型 RAA 试剂盒(杭州众测生物科技有限公司),TransStart Probe qPCR SuperMix(2 $\times$ ,北京全式金生物技术有限公司),营养肉汤培养基、脑心浸液培养基、营养琼脂平板均购自北京陆桥技术有限责任公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌培养

所有的铜绿假单胞菌和疑似铜绿假单胞菌使用营养肉汤培养基,37℃过夜培养;其他细菌使用含有5%小牛血清和0.01%烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的脑心浸液培养基,37℃过夜培养。对铜绿假单胞菌标准菌株(ATCC 9027)过夜培养物进行10倍系列稀释,同时取100  $\mu$ L系列稀释液在营养琼脂平板上涂板,37℃过夜培养后进行平板计数。每一个稀释度涂三个平板。

### 1.2.2 细菌基因组DNA的提取

使用细菌DNA提取试剂盒进行铜绿假单胞菌标准菌株(ATCC 9027)基因组DNA的提取,使用ND-

2000c 核酸浓度测定仪对基因组 DNA 进行浓度测定。其他细菌采用直接水煮法提取基因组 DNA。取 1 mL 过夜培养的细菌液, 12 000×g 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀使用 1 mL 去离子水充分清洗, 12 000×g 离心 5 min。将沉淀重悬于 200 μL 去离子水, 100 °C 水浴中水煮 10 min, 12 000×g 离心 3 min, 取上清作为后续检测模板。所有核酸保存于 -80 °C 备用。

### 1.2.3 real-time RAA 引物和 exo 探针的设计

*ecfX* 基因是铜绿假单胞菌特异性内部标准基

因, 因此将该基因作为 RAA 扩增的靶基因<sup>[23-25]</sup>。根据 GenBank 中不同株铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因序列 (登录号: CP027166, CP037925, CP028332, CP032541, CP032540, CP031677), 分析获得高度保守性区域, 并以此作为靶序列设计 real-time RAA 引物和 exo 探针, 同时根据文献<sup>[23]</sup>合成 real-time PCR 方法所用引物探针, 具体信息见表 2。所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 本试验使用的引物探针序列信息

Table 2 Sequences of the primers and probes used in this study

方法	引物探针	序列(5'-3')	扩增大小/bp
real-time RAA	<i>ecfX</i> -exo-F	TGAGCGCTTCCGTGGTTCCGTCTCGCATGCCT	202
	<i>ecfX</i> -exo-R	CAACAAGTTGCGGGCGATCTGAAAAGAAATGC	
	<i>ecfX</i> -exo-P	TCAGGCGTTCCATGGCGAGTTGCTGCGCT (FAM-dT) C (THF) (BHQ1-dT) GCGCAAGCACCTGG-C3spacer	
real-time PCR	<i>ecfX</i> -F	CGCATGCCTATCAGGCGTT	64
	<i>ecfX</i> -R	GAAGTCCCAGGTGCTTGC	
	<i>ecfX</i> -P	FAM-ATGGCGAGTTGCTGCGCTTCT-BHQ1	

### 1.2.4 real-time RAA 方法的建立

使用荧光型反应试剂, 建立铜绿假单胞菌 real-time RAA 方法。使用 40.5 μL 重悬液 Buffer A 溶解反应管中冻干粉, 并加入上下游引物 (*ecfX*-exo-F, *ecfX*-exo-R, 10 μmol/L) 各 2.1 μL、exo 探针 (*ecfX*-exo-P, 10 μmol/L) 0.8 μL、1 μL 基因组 DNA 模板和 1 μL ddH<sub>2</sub>O, 最后加入 2.5 μL Buffer B (醋酸镁, 280 mmol/L), 总反应体系为 50 μL。充分颠倒混匀 5~6 次后, 瞬时离心, 将反应管置于 GenieIII 等温荧光扩增仪中, 39 °C 等温条件下反应 20 min, 实时监测扩增结果。

### 1.2.5 real-time RAA 方法的特异性和灵敏性

使用表 1 中所列出细菌进行 real-time RAA 方法的特异性分析, 重复三次。将铜绿假单胞菌标准菌株 (ATCC 9027) 基因组 DNA 进行 10 倍倍比稀释, 浓度范围在  $3.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^0$  fg/μL 之间, 使用 1 μL 作为模板, 进行方法的灵敏性分析, 重复三次。同时, 对过夜培养的铜绿假单胞菌标准菌株 (ATCC 9027) 进行 10 倍倍比稀释, 浓度范围在  $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^0$  CFU/mL 之间, 并取 1 mL 菌液提取基因组 DNA 作为模板, 进行方法的灵敏性分析, 重复三次。同时与 real-time PCR 方法进行比较, real-time PCR 方法参照文献<sup>[23]</sup>中的反应条件进行。

### 1.2.6 对疑似菌株的检测

以不同来源的 36 株疑似铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板, 使用本试验建立的 real-time RAA 方法进行检测, 同时根据文献<sup>[23]</sup>中的 real-time PCR 方法

进行检测。选用 VITEK 阴性菌鉴定卡, 通过 VITEK 2 Compact 30 全自动微生物鉴定系统对上述 36 株细菌进行鉴定, 比较上述三种方法的检测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 real-time RAA 方法的特异性

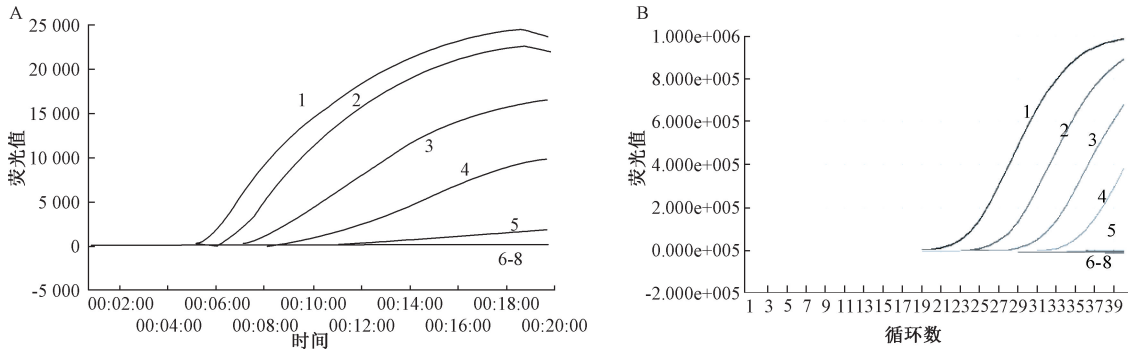
特异性分析表明, 所建立的 real-time RAA 方法仅对铜绿假单胞菌出现特异性扩增, 而对其他常见假单胞菌、动物源性致病菌和食源性致病菌没有出现扩增。三次重复结果一致, 说明本试验建立的方法具有良好的特异性和可重现性。

### 2.2 real-time RAA 方法的灵敏性

灵敏性分析表明, 以浓度为  $3.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^0$  fg/μL 的铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板, 所建立的 real-time RAA 方法检出限为  $3.0 \times 10^3$  fg/反应 (图 1A); 进一步对基因组 DNA 进行 2 倍稀释, 使浓度在  $3.0 \times 10^3 \sim 3.75 \times 10^2$  fg/μL 之间, 以此为模板进行检测, real-time RAA 方法的检出限依然为  $3.0 \times 10^3$  fg/反应。与 real-time PCR 方法比较 (图 1B), 两者检出限一致。其次, 所建立的 real-time RAA 方法对铜绿假单胞菌纯培养物的检出限为  $1.0 \times 10^3$  CFU/反应, 三次重复结果一致。

### 2.3 对疑似菌株的检测结果

结果表明, 所建立的 real-time RAA 方法对 36 株疑似菌株均检测为铜绿假单胞菌, 同 real-time PCR 方法检测结果一致 (表 3)。进一步经 VITEK 2 Compact 鉴定, 36 株疑似菌株均鉴定为铜绿假单胞



注:1~8 为 10 倍倍比稀释浓度范围  $3.0 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^0$  fg/ $\mu$ L

图 1 Real-time RAA(A) 和 real-time PCR(B) 方法对铜绿假单胞菌基因组 DNA 的检出限

Figure 1 Limit of detection of the real-time RAA (A) and real-time PCR (B) for the *P. aeruginosa* genomic DNA

表 3 Real-time RAA、real-time PCR 方法对临床分离的疑似铜绿假单胞菌检测结果比较

Table 3 Comparison of *P. aeruginosa* real-time RAA and real-time PCR assays for detection of field isolates

来源	real-time PCR Ct 值	real-time RAA 时间	来源	real-time PCR Ct 值	real-time RAA 时间
患乳房炎奶牛的牛奶	22.74	5'14"	桶装饮用水	22.59	5'30"
患乳房炎奶牛的牛奶	21.07	5'26"	桶装饮用水	23.41	5'45"
患乳房炎奶牛的牛奶	23.47	5'25"	桶装饮用水	23.00	5'32"
死亡狐狸肝脏	21.34	5'26"	桶装饮用水	23.49	5'55"
死亡绵羊肺脏	22.59	5'32"	桶装饮用水	23.94	5'40"
死亡绵羊肺脏	23.24	5'21"	桶装饮用水	23.56	5'42"
死亡绵羊肺脏	22.81	5'19"	桶装饮用水	23.14	5'39"
鸡腿	22.89	5'26"	桶装饮用水	21.05	5'21"
蔬菜沙拉	22.81	5'19"	桶装饮用水	23.23	5'11"
蔬菜沙拉	22.58	5'53"	桶装饮用水	21.49	5'21"
蔬菜沙拉	23.25	5'50"	桶装饮用水	23.01	5'54"
桶装饮用水	24.61	6'02"	桶装饮用水	23.21	5'49"
桶装饮用水	22.40	5'22"	桶装饮用水	23.05	5'58"
桶装饮用水	21.98	5'16"	桶装饮用水	22.41	5'17"
桶装饮用水	22.14	5'23"	桶装饮用水	22.56	5'35"
桶装饮用水	23.26	5'33"	桶装饮用水	21.69	5'15"
桶装饮用水	22.17	5'21"	桶装饮用水	23.10	5'30"
桶装饮用水	22.43	5'14"	桶装饮用水	22.71	5'41"

菌。所建立的 real-time RAA 方法能够在 5~6 min 实现对疑似菌株的准确鉴定,而 real-time PCR 方法对疑似菌株的扩增循环数(Ct 值)在 21.34~24.61 之间,大约需要 30 min。

### 3 讨论

本试验基于铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因,建立了能够在 39℃ 等温条件下,20 min 内实现对不同来源铜绿假单胞菌特异性快速检测的 real-time RAA 方法。该方法仅特异性扩增铜绿假单胞菌,对其他常见的恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌和施氏假单胞菌等没有任何扩增,同时该方法具有良好的灵敏性,与 ANUJ 等<sup>[23]</sup>建立的 real-time PCR 法灵敏性结果一致。与国内金晓君等<sup>[24]</sup>建立的铜绿假单胞菌重组酶聚合酶扩增方法比较,本试验建立的 real-time RAA 方法对纯培养的灵敏性为  $10^3$  CFU/反应,低于其 1 个灵敏度,但不同提取试剂会存在提取效率的

差异;其次本试验采用自临床分类的疑似菌株(36 株)作为方法评估的材料,并且与 real-time PCR 和 VITEK 2 Compact 方法进行比较,进一步增加了该方法的可靠性;再次本试验采用 GenieIII 便携式等温荧光扩增设备进行 real-time RAA 反应,设备体积小、重量轻,携带电池工作,可有效应用于基层实验室和现场检测。而金晓君等<sup>[24]</sup>以荧光定量 PCR 仪进行重组酶聚合酶扩增铜绿假单胞菌,由于荧光定量 PCR 仪的热盖功能直接影响 real-time RAA 反应,导致扩增曲线不稳定或产生“异型曲线”,且循环数为横坐标,会导致不同荧光定量 PCR 仪判定标准存在误差,不是所有的荧光定量 PCR 仪都适用于 real-time RAA 试验,其次采用昂贵的荧光定量 PCR 仪难以实现基层实验室和现场检测。

多个研究<sup>[20,25-29]</sup>表明,在铜绿假单胞菌检测中,核酸检测方法较传统生化鉴定方法具有诸多优势。对于核酸检测方法,靶基因的选择至关重要。目

前,基于铜绿假单胞菌不同基因,建立了多种不同的核酸检测方法,但是在实际应用中表现各有不同,特异性在74%~100%之间<sup>[23,27,29-30]</sup>。研究表明,基于16S rRNA、*ITS*、*fliC*、*oprI*、*oprL*基因的铜绿假单胞菌核酸检测方法均有“假阳性”结果的报道,而基于*ETA*、*algD*和*oxA*基因的方法则有“假阴性”结果的报道<sup>[23,31]</sup>。而*ecfX*基因是铜绿假单胞菌种特异性鉴别基因,编码胞外功能 $\sigma$ 因子,具有对胞外激素刺激协调转录的功能,可有效用于该菌的检测<sup>[20,23,25-26]</sup>,因此本试验采用*ecfX*基因作为real-time RAA方法的靶基因。试验结果也表明,以*ecfX*基因为靶基因所建立的real-time RAA方法对铜绿假单胞菌的特异性为100%。

在对不同来源的疑似铜绿假单胞菌检测中,real-time RAA、real-time PCR和基于传统生化反应的VITEK 2 Compact的检测鉴定结果一致,但是real-time RAA法仅需要约5~6 min即可完成检测,明显少于real-time PCR(约30 min)和VITEK 2 Compact(约4 h)方法。本试验中,临床分离的铜绿假单胞菌来源广泛,包括桶装饮用水、食品和动物脏器。菌株来源的广泛性进一步证明了所建立的real-time RAA方法具有广泛的适用性和良好的应用前景。

总之,基于*ecfX*基因建立的铜绿假单胞菌real-time RAA方法特异性强、灵敏性高、操作简单、反应迅速,不需要装备完善的实验室设备,可实现现场检测,可以作为一种快速准确检测不同来源铜绿假单胞菌的有效工具。

## 参考文献

- [1] AOI Y, NAKATA H, KIDA H. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Ushubetsu River water in Hokkaido, Japan[J]. The Japanese Journal of Veterinary Research, 2000, 48(1): 29-34.
- [2] COLINON C, DEREDJIAN A, HIEN E, et al. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in soil and manure assessed by an *ecfX* qPCR assay [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(6):1734-1749.
- [3] DALY M, POWER E, BJORKROTH J, et al. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6):2723-2729.
- [4] SCHWARTZ T, VOLKMAN H, KIRCHEN S, et al. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 57(1):158-167.
- [5] WALKER T S, BAIS H P, DEZIEL E, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation [J]. Plant Physiol, 2004, 134(1):320-331.
- [6] WARBURTON D, HARRISON B, CRAWFORD C, et al. A further review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada: 1992-1997 survey results[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 39(3):221-226.
- [7] WARBURTON D W, DODDS K L, BURKE R, et al. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989 [J]. Can J Microbiol, 1992, 38(1):12-19.
- [8] DESCHAGHT P, SCHELSTRAETE P, SANTIAGO G L D S, et al. Comparison of culture and qPCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in not chronically infected cystic fibrosis patients[J]. BMC Microbiol, 2010, 10(1):245-250.
- [9] GELLATLY S L, HANCOCK R E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses [J]. Pathog Dis, 2013, 67(3):159-173.
- [10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水:GB 8537—2018 [S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- [11] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 包装饮用水生产卫生规范:GB 19304—2018 [S]. 北京:中国标准出版社,2018.
- [12] 王文娟,颜瑛,罗玉彬,等. 江西省矿泉水和包装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(3): 419-421.
- [13] 蔡双福,张琴,黄耀雄. 食品中铜绿假单胞菌的监测分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6):875-876.
- [14] JIN W Y, JANG S J, LEE M J, et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(4): 442-447.
- [15] MAUCH R M, ROSSI C L, RIBEIRO J D, et al. Assessment of IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Diagn Pathol, 2014, 9(1):158.
- [16] WEBSTER T A, SISMAET H J, CONTE J L, et al. Electrochemical detection of *Pseudomonas aeruginosa* in human fluid samples via pyocyanin[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 60(4):265-270.
- [17] CHEN Y, CHENG N, XU Y, et al. Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 81:317-323.
- [18] DESCHAGHT P, VAN DAELE S, DE BAETS F, et al. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review [J]. J Cyst Fibros, 2011, 10(5):293-297.
- [19] DONG D R, ZOU D Y, LIU H, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from Beijing [J]. China Front Microbiol, 2015, 6:1100.
- [20] GOTO M, SHIMADA K, SATO A, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-

- mediated isothermal amplification [J]. J Microbiol Methods, 2010, 81(3):247-252.
- [21] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7):947-958.
- [22] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. The Analyst, 2018, 144(1):31-67.
- [23] ANUJ S N, WHILEY D M, KIDD T J, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 63(2):127-131.
- [24] 金晓君, 龚雅利, 杨莉, 等. 重组酶聚合酶扩增在铜绿假单胞菌检测中的应用 [J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(4):233-239.
- [25] HILLENBRAND M E, THOMPSON P P, SHANKS R M, et al. Validation of PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* from corneal samples [J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(3):262-268.
- [26] LAVENIR R, JOCKTANE D, LAURENT F, et al. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(1):20-29.
- [27] BLANCHARD A C, ROONEY A M, YAU Y, et al. Early detection using qPCR of *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis undergoing eradication treatment [J]. J Cyst Fibros, 2018, 17(6):723-728.
- [28] MERAULT N, RUSNIOK C, JARRAUD S, et al. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(5):1708-1717.
- [29] SILVA F L V, TATENO A F, VELLOSO L F, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR [J]. Pediatr Pulmonol, 2004, 37(6):537-547.
- [30] DE VOS D, LIM A, PIRNAY J P, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL* [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6):1295-1299.
- [31] CHOI H J, KIM M H, CHO M S, et al. Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(8):3643-3651.

## · 资讯 ·

# 加拿大拟修订乙酰甲胺磷和甲胺磷在部分食品中的最大残留限量

2020年8月18日,加拿大卫生部发布PMRL2020-24号通知,有害生物管理局拟修订乙酰甲胺磷和甲胺磷(acephate and methamidophos)在部分食品中的最大残留限量。具体拟修订内容如下:

商品	当前最大残留限量(ppm)		拟修订的最大限量(ppm)	
	乙酰甲胺磷	甲胺磷	乙酰甲胺磷	甲胺磷
豆子	1.0	0.3	将食品商品描述符修改为特定的干豆商品	将食品商品描述符修改为特定的干豆商品
西兰花	0.1	1.0	无修订	撤销 MRL
谷物	0.5	0.1	将食品商品描述符修改为“甜玉米仁加玉米棒”,并去除果壳	无修订
黄瓜	0.1	0.5	无修订	撤销 MRL
茄子	0.1	0.5	无修订	撤销 MRL
莴苣	1.0	1.0	将食品商品描述符修改为结球莴苣	将食品商品描述符修改为结球莴苣
牛奶	0.05	0.1	撤销 MRL	无修订
土豆	0.5	0.1	撤销 MRL	撤销 MRL
番茄	0.1	0.5	无修订	撤销 MRL

(来源食品伙伴网,相关链接:<http://news.foodmate.net/2020/08/569542.html>)