



专论与综述

乳及乳制品中病原微生物溯源技术研究进展

张瑞瑞^{1,2} 刘慧敏^{1,3} 孟璐^{1,3} 董蕾^{1,3} 胡海燕^{1,3} 郑楠^{*1,3} 王加启^{1,3} 程建波²

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部奶及奶制品质量安全控制重点实验室 北京 100193

2 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230000

3 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京)
北京 100193

摘要: 牛奶营养丰富,素有“白色血液”之称,随着公众对食源性疾病原因和来源问责制的需求增加,准确追踪特定食源性病原微生物在暴发过程中所经过的途径变得越来越重要。微生物溯源研究有助于人们更深入地了解病原微生物种群结构及其多样性的起源和进化,为病原微生物的检验、流行监测、综合防治等研究提供重要的信息资料和科学依据。在牛奶中病原微生物溯源技术研究中,光谱技术、质谱技术、分子方法、全基因组测序等方法均发挥了重要作用。本文根据近年国内外相关文献资料,对检测奶及奶制品中病原微生物常用溯源技术的原理和应用进行了概述。

关键词: 牛奶,病原微生物,溯源,微生物来源追踪

Research progress in traceability technology of pathogenic microorganisms in milk

ZHANG Ruirui^{1,2} LIU Huimin^{1,3} MENG Lu^{1,3} DONG Lei^{1,3} HU Haiyan^{1,3}
ZHENG Nan^{*1,3} WANG Jiaqi^{1,3} CHENG Jianbo²

1 Key Laboratory of Quality & Safety Control for Milk and Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230000, China

3 Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Milk is known as “white blood” due to its nutrients. It is becoming more and more important for the traceability of pathogenic bacteria, as the public’s demand for the causes of foodborne diseases increases. The traceability technology could help to understand the structure of pathogenic microorganisms and their diversity origin and evolution, that provides important scientific basis for pathogenic

Foundation items: Modern Agro-Industry Technology Research System of China (CARS-36); Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ASTIP-IAS12); Scientific Research Project for Major Achievements of Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ZDXT2019004)

***Corresponding author:** E-mail: zhengnan_1980@126.com

Received: 17-06-2020; **Accepted:** 07-11-2020; **Published online:** 23-03-2021

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-36); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS12); 中国农业科学院农业科技创新工程重大产出科研选题(CAAS-ZDXT2019004)

***通信作者:** E-mail: zhengnan_1980@126.com

收稿日期: 2020-06-17; **接受日期:** 2020-11-07; **网络首发日期:** 2021-03-23

microorganism inspection, epidemic monitoring, prevention and control. Methods such as spectral analysis, mass spectrometry, molecular methods, and whole genome sequencing have played important roles in the traceability technology of pathogenic microorganisms in milk. This paper summarizes the principles and applications of traceability techniques commonly used to track pathogenic microorganisms in milk and milk products.

Keywords: milk, pathogenic microorganisms, traceability, microbial source tracking

自 21 世纪以来, 中国经济社会快速发展, 国民消费水平日益提升, 国民体质的健康为更多人所关注。伴随着“一杯奶, 强壮一个民族”的口号, 牛奶已经成为人们, 尤其是青少年日常饮食中不可或缺的重要组成, 其安全性自然也会受到越来越多的关注。目前对乳及乳制品中病原微生物流行程度的研究越来越多, 如单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)^[1]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[2]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[3]、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)^[4-5]、沙门氏菌属(*Salmonella*)^[6-9]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[10]等。病原微生物不仅损害奶牛的健康, 具有致病性还会影响牛奶的品质^[11-12]。正常的巴氏杀菌和超高温瞬时灭菌(Ultra-High Temperature Instantaneous Sterilization, UHT)可以杀灭大多数的细菌, 但微生物在低温储藏时产生的蛋白水解酶和脂肪水解酶等具有较强的耐热力, 影响乳及乳制品的品质。2010 年意大利发生“蓝色奶酪”案, 是由病原微生物假单胞菌(*Pseudomonas adaceae*)引发的食品污染事件, 造成了严重的经济损失^[13]。Lan 等从中国 5 个省份的乳腺炎奶牛收集的 497 个样品中鉴定出 92 株大肠杆菌, 在 75 个具有 *eae* 基因的大肠杆菌菌株中观察到 5 种内膜素类型(μ R-1、 λ 、 ξ R/ β 2、 ν R- ϵ 2、 η), 所有内膜素均首次在牛乳腺炎牛奶中检测到^[14]; Yong 等研究婴幼儿配方奶粉样品时曾报道, 蜡样芽孢杆菌 ST-26 是 *B. cereus* 中重要的序列类型, 而且在世界范围内广泛分布^[15]。由此可见, 乳及乳制品中的微生物不仅致病还会造成巨大的经济损失, 乳及乳制品的安全问题值得也必须受到更为广泛的关注。对病原微生物进行溯源, 有利于针对性地对卫生管理与操作规范进行加强, 预防病原微生物的污染。

结合牛奶生产的整个过程来看, 从奶牛繁育、饲料储运和供给, 到奶牛场建设与环境、饲养管理、奶牛疫病防治, 再到生乳的储运和验收及乳制品加工, 包括诸如水源^[16]、饲料^[17]、牛场卫生条件^[18]、奶牛机体^[19]、机械加工设备^[20-21]等任何因素都会对牛奶的品质产生重大影响。

我们团队一直围绕着奶牛健康、乳及乳制品中的微生物进行了相关的研究, 发现由于抗生素的不规范使用, 造成病原微生物如大肠杆菌^[22]、金黄色葡萄球菌^[23]、假单胞菌属^[24]、葡萄球菌^[25]的耐药现象越来越严重, 有必要对这些病原微生物的来源进行追踪, 以利于控制奶牛乳房炎发生的几率, 进而减少抗生素的使用。然而, 传统的溯源技术时间周期长, 检测结果的敏感性和准确性也不够高, 已经难以解决日益增长的牛奶质量和安全问题。因此, 越来越多的学者开始致力溯源技术的改进和创新(如 PCR 等分子方法, 发展至今已经相当成熟), 在生产-销售链中追溯奶及奶制品微生物来源的研究, 以最大力度减少公共健康风险。本文对近几年乳及乳制品中病原微生物进行溯源追踪常用的几种溯源技术的研究进展进行综述。

1 光谱技术

拉曼光谱(Raman Spectra)是指利用印度科学家 C.V.拉曼(Raman)所发现的拉曼散射效应, 即当光通过透明介质时被分子散射的光频率发生变化, 通过对与入射光频率不同的散射光谱进行分析, 以获得分子振动以及转动的相关数据信息, 常用于分子结构研究。

生活在不同地区或不同宿主的微生物类群, 在自然选择压力下会产生特异的环境适应性, 并将这些特性整合到基因组中遗传给后代, 从而使

这一地区的微生物带有其生存环境的特异性指纹图谱,通过分析这些呈现出多样性的表型或基因型特征,便可以达到溯源的目的。乳及乳制品成分复杂,微生物的检测难度大,需要更加有效和简单的检测技术来鉴定区分病原微生物,以达到溯源的目的。

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)噬菌体是导致乳制品行业出现问题的主要噬菌体。Tayyarcán 等开发了一种结合拉曼光谱法和化学计量学分析的方法来检测生乳中噬菌体的存在,通过拉曼光谱法可以检测到低浓度的嗜热链球菌噬菌体(10^2 PFU/mL),而且分析时间短(60 min),测定系数(R^2)值高,可同时进行校正(0.985)和验证(0.906)校准的均方根误差为 70.54,预测的均方根误差为 165.47;但是保加利亚乳杆菌噬菌体获得的成功率较低,并且获得的测定系数值不够高(0.649)^[26]。该方法可以很好地鉴定出嗜热链球菌,通过比较可能污染源中的嗜热链球菌是否一致来追踪传染源,为受到嗜热链球菌污染的奶制品提供了更快的可追溯性分析。

Xie 等将可能含有鼠伤寒沙门氏菌的待检测牛奶添加到含有重水的培养基中进行培养,然后收集培养的鼠伤寒沙门氏菌细胞并进行拉曼光谱扫描,并对获得的原始拉曼光谱进行分析和处理,从而检测出待检测牛奶中的鼠伤寒沙门氏菌,检出限为 10^4 – 10^8 CFU/mL^[27]。Feng 等结合重水(D_2O)标记和拉曼光谱测量细菌代谢活性,开发了一种快速灵敏检测牛奶中鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的检测方法,检测时间大约 4–8 h,回收率高达 95.41%–106.6%^[28]。该方法具有检测时间短、灵敏度高、成本低、操作简便、实施方便、快捷等优点,是一种快速检测鼠伤寒沙门氏菌的理想方法,具有极好的实际应用前景,非常适合应用于食品安全等领域,也为受到鼠伤寒沙门氏菌污染的奶制品提供了更快的可追溯性分析。

2 质谱技术

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)的基本原理是利用基质能够吸收激光能量的特性,通过激光对基质中样品晶体进行照射,使基质与样品间发生电荷转移,样品解吸附,样品分子电离,然后利用电场使样品分子到达检测器,根据其到达检测器的飞行时间差异达到检测的目的。

MALDI-TOF-MS 可以非常快速地诊断出固体培养基上分离出的细菌、真菌菌落上的物种,可以直接从阳性血培养瓶或某些样品如尿液中鉴定细菌,还可以用于鉴定复杂食物链中食物破坏者和食源性病原体的属、种、分离株,追踪大量食源性病原微生物^[29–31]。但对李斯特菌属的精确区分依然是目前环境和食品安全中的关键问题。Ojima-Kato 等开发了一种基于 MALDI-TOF-MS 的应变解决方案新型软件,构建了一个准确可靠的 MS 数据库,利用 S10-GERMS 方法来解决李斯特菌的系谱和种类,即单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)、威尔斯李斯特菌(*Listeria welshimeri*)、西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*)、*Listeria ivanovii*、格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)、*Listeria rocourtiae* 的精确区分问题,实现物种或血清型水平微生物的全自动鉴定^[32],为受李斯特菌污染的奶制品提供更快的可追溯性分析。Goldstein 等使用 MALDI-TOF-MS 表征了由在 2 种培养条件下(琼脂和肉汤)并使用完整细胞法(Intact Cell Method)和蛋白质提取法(Protein Extraction Method, PEM)这 2 种样品制备方法分离出的 5 个对甲氧西林不耐药(Methicillin-Sensitive, MSSA)和 5 个对甲氧西林耐药(Methicillin-Resistant, MRSA)的金黄色葡萄球菌组成的模型系统及对金黄色葡萄球菌谱分析的影响,认为肉汤培养在增加峰数方面进一步改善了光谱质量,PEM 促进了峰数和质量范围宽度的增加,提高了在相同培

养条件下制备样品的重现性, 所有结果表明肉汤/PEM可最大限度地发挥MALDI-TOF-MS表征金黄色葡萄球菌的性能; 该方法可以在使用MALDI-TOF-MS系统的实验室广泛应用, 以进行除常规指纹识别之外的菌株或血清型水平的微生物分类, 为受金黄色葡萄球菌污染的奶制品提供更快的可追溯性分析。该研究将为区分临床和诊断实验室以及食品相关行业中的细菌开辟新的窗口^[33]。

MALDI-TOF-MS 越来越多地被用作一种可靠的技术来鉴定病原微生物, 但该方法也有一定的局限性。Rim 等的研究是第一篇仅关注MALDI-TOF-MS与PFGE相比的树状图功能的论文, 研究发现MALDI-TOF-MS不能替代PFGE进行鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的克隆性分析^[34]。另外, MALDI-TOF-MS对于某些重要的病原微生物无法进行准确的亚分化, Lasch等选择了112株粪肠球菌分离株(CC2、CC5、CC9、CC17、CC22、CC25、CC26、CC92、CC92、CC92)总共52种多位点ST和59种不同的金黄色葡萄球菌对MALDI-TOF MS进行评估, 发现MALDI-TOF-MS的鉴别能力并不能够将粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和金黄色葡萄球菌分离物亚分化为不同克隆或克隆复合物的水平^[35]。Hsueh等选择了147种需氧生长的革兰氏阳性棒状(Gram Negative Rod, GPR)分离菌株, 这些菌株均已用常规方法或分子方法或同时通过这2种方法鉴定, 进而对MALDI-TOF-MS系统进行评估, 结果表明该系统并不能对所有的分离株进行准确的物种级鉴定, 需要不断扩展MALDI-TOF-MS数据库以鉴定更多的GPR^[36]。

MALDI-TOF/TOF-MS 串联质谱仪器的开发, 使蛋白质组学方法可用于鉴定菌株特异性生物标志物, 多元统计量用于区分分离物的光谱, 并使簇与表型相关^[37]。该方法将发展成为跟踪和追踪食物变质以及食物致病性菌株和分离株必不可少的工具。

3 分子方法

3.1 PCR 技术

3.1.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR技术通过人为控制体外合成系统的温度, 使体外双链DNA分子变性解旋成为单链结构, 通过引物与单链DNA分子的结合形成引物单链DNA复合物, 以及利用聚合酶在dNTP存在的条件下使引物沿单链DNA模板延伸形成双链DNA, 并重复上述过程以达到指数式扩增DNA分子的需求^[38]。

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和链球菌等致病菌通常会引发奶牛乳房炎, 造成奶牛产量降低和废奶量增加。Liu等从中国北方4个城市的195个奶牛场收集了195份生乳样品, 采用培养基分离和PCR鉴定的方法发现54份(27.7%)样品呈葡萄球菌阳性, 并分离得到54株金黄色葡萄球菌, 其中16株耐甲氧西林葡萄球菌, 这些菌株对青霉素G(85.2%)、氨苄青霉素(79.6%)、红霉素(46.3%)有较高耐药性; 此外, 72%的菌株表现出对一种以上抗菌剂的耐药性; 总的来说, 63%的青霉素耐药菌株具有*blaZ*基因, 60%的红霉素耐药菌株具有*erm(A)*、*erm(B)*、*erm(C)*、*msr(A)*或*msr(B)*基因8种不同的基因模式; 对庆大霉素、卡那霉素和奥拉西林耐药的菌株均分别携带*aac6'-aph2''*、*ant(4')-Ia*和*mecA*基因; 2株*tet(M)*阳性分离株携带*Tn916-Tn1545*转座子特异基因; 最主要的毒力基因是*sec*、*sea*和*pvl*, 它们分别编码葡萄球菌肠毒素(*sec*和*sea*)和杀白细胞介素(Panton-Valentine Leukocidin); 32个分离株(59.2%)具有一个或多个毒力基因; 大多数葡萄球菌具有多重耐药性, 并携带多种毒力基因, 可能对公众健康构成威胁; 建议用抗生素特别是青霉素和氨苄青霉素治疗葡萄球菌引起的乳房炎要格外慎重^[23]。PCR技术是方法学上的一次革命, 大大加速了分子生物学各学科的研究进展。

3.1.2 定量即时聚合酶链锁反应/实时定量 PCR (Quantitative Real Time polymerase Chain Reaction/Real-Time Quantitative PCR, RT-qPCR/q-PCR)

q-PCR利用荧光标记在PCR指数扩增期间, 对

荧光信号强弱的变化进行连续监测,达到即时测定特异性产物的量的目的。

食品化合物对 PCR 的抑制作用很高,会经常出现假阴性结果,使受病原微生物污染的乳及乳制品进行可追溯性分析时的难度增加,而 q-PCR 在检测沙门氏菌时可以避免假阳性。Demirci 等从 48 头奶牛、65 头山羊、65 头绵羊、53 头驴共收集 231 份奶样品进行研究,采用 ISO6579:2002 和 ISO21567:2004 方法、抗菌药敏试验和血清分型之后,通过 MALDI-TOF-MS 对病原微生物进行物种和亚种区分,5 份羊奶样品(2.16%)呈沙门氏菌属阳性,而通过 q-PCR 检测发现仅 2 份羊奶样品(0.87%)呈沙门氏菌属阳性,并且所有的牛奶样品均不含沙门氏菌和志贺氏菌属(*Shigella genera*)^[39]。Hernández 等开发并测试了 q-PCR 分析法用于针对产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的物种特异性检测,该检测针对磷脂酶 C (Phospholipase C, *plc*)基因并包括内部扩增对照,从而避免假阴性结果的出现,用 25 mL 人工污染的生乳评估了 q-PCR 分析的适用性,通过 q-PCR 检测到 300 个孢子,检出率为 78%,实际定量限为每 25 mL 牛奶 3 000 孢子, q-PCR 分析结果与标准平板测定的每毫升孢子数之间的对应关系表明,其准确度为 83.03%–151.18%,这种 q-PCR 方法可有效检测和定量牛奶中的产气荚膜梭菌^[40]。因不同地区的微生物群在其生存环境中有着特异性的指纹图谱,通过比较污染样品和可能污染源中的产气荚膜梭菌是否一致,可以对受产气荚膜梭菌污染的奶制品进行追踪,达到溯源的目的。

q-PCR 可以区分菌株并鉴定单核细胞增生李斯特菌血清型的亚型,但是 q-PCR 的准确性受引物、模板 DNA 的质量、抑制剂的存在、样品、引物、探针和酶处理和储存的影响^[41]。与常规 PCR 相比 q-PCR 具有更强的特异性、自动化程度高等特点,还可以有效解决 PCR 污染问题,被广泛地应用于分子生物学的各个领域。

3.1.3 多重聚合酶链反应(Multiplex PCR, mPCR)

mPCR 技术用于多种病原微生物的同时检测和

某些病原微生物的分型鉴定。其反应原理、反应试剂、操作过程与一般 PCR 并无不同,其差异在于 mPCR 技术在同一 PCR 反应体系里的引物数量 n ($n \geq 2$),可同时扩增出多个核酸片段。

Wei 等开发了一种 mPCR 技术用于同时检测培养液和人工食品基质中的这些食源性病原微生物,用病原微生物中的 *rfbE*、*nuc* 和 *invA* 基因的特异性 DNA 序列设计引物,分别用于鉴定大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌,扩增得到了不受其他非特异性条带污染的物种特异性条带,该测定方法在培养液中的检测灵敏度为 10^3 CFU/mL,与 mPCR 在食品样品中的检测限一致^[42],该方法能够准确地鉴定出大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌,通过比较可能污染源中的大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌是否一致,就可以达到溯源的目的。这是一种操作简便的检测方法,对微生物流行病学和食品安全性研究具有重要意义。

3.2 基于 PCR 技术

3.2.1 多位点可变数目串联重复序列分析(Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis, MLVA)

MLVA 在 PCR 技术的基础上通过对基因组上多个具有多态性串联重复序列位点 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR)重复数的测定达到区分菌株的目的。因其准确、简洁、高效等优点,多应用于流行病溯源分析。

Ung 等在法国对 2 914 人进行了关于沙门氏菌感染问卷调查,并以食物的消费量为依据对不同类别的 83 个病例采用全基因组测序(Whole Genome Sequencing, WGS)和 MLVA 方法进行分析,以鉴定微生物群与病例、动物、食物来源之间的联系,发现 76%病例($n=63$)与食用沙门氏菌污染的生乳奶酪有关^[43]。

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌属(*Brucella*)引起的一种人畜共患病,一直被认为是从事畜牧行业的职业病,但现在布鲁氏菌病已经成为了一种传染病,

影响所有年龄段人群的健康。Dal 等报道了平均年龄为 9.14 ± 3.4 岁儿童食用未经巴氏消毒的牛奶感染布鲁氏菌病, 采用常规 PCR 方法鉴定了 77 株布鲁氏菌, 通过使用 MLVA 对菌株进行基因分型, 发现儿童布鲁氏菌病主要是由相同来源(Common Sources)引起的, 控制动物的活动并避免摄入污染奶制品对阻断儿童布鲁氏菌病的传播很重要^[44]。MLVA 技术已在全世界布鲁氏菌属的分子流行病学中广泛使用。Ma 等从青海的人、畜禽、野生动物中获得了 65 株布鲁氏菌属分离株, 采用 MLVA 和多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)分为 *B. melitensis* (60)、*B. abortus* (4)、和 *B. suis* (1)共 3 个种, 发现青海地区至少有 3 种特有的布鲁氏菌, 可能是由于青海省独特的地理位置所致^[45]。Singh 等对印度某地区 47 个牛场的 136 个样品采用 MLVA 进行分析, 并与之前使用 MLVA 研究印度分离株的数据(<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/database>)进行了比较, 从其中 6 个农场中获得了 11 株流产双歧杆菌(*Bifidobacterium*); 在 MLVA-16 分析中, 虽然分离株被归为单个聚类, 但得到了 5 个基因型, 每个农场都有一个特定的基因型流行, 该研究表明, MLVA-16 能够在具有高度遗传相似性地区的分离株之间区分流产双歧杆菌^[46]。Ali 等通过 MLVA-16 分型对巴基斯坦不同地区最近流产牛的流产胎儿、牛奶、阴道拭子中收集的样品进行分子分型, 再通过常规培养方法和 PCR 对结果进行证实, 发现所有菌株均具有相同的 MLVA-16 谱图, 认为同一基因型的流产双歧杆菌在巴基斯坦不同地区流行是该感染在巴基斯坦传播的主要原因^[47]。这些数据将有助于制定巴基斯坦人与牛布鲁氏菌病的预防和控制策略。

3.2.2 多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)

不同的菌株有着不同的 ST, MLST 技术便是在此基础上, 通过对多个管家基因(Housekeeping Gene) 450 bp 左右核心片段的核酸序列进行测序, 实现其等位基因多样性的比较。因其操作简便、辨识度高,

易于不同实验室进行比较, 因此被广泛应用于国际间的菌株比较。

布氏弓形杆菌(*Arcobacter butzleri*, *A. butzleri*)是一种能够引起肠道疾病的人畜共患食源性病原微生物。Caruso 等对从 396 个奶牛场中收集的样品处理后采用 MLST 表征, 认为布氏弓形杆菌是牛奶和奶制品中最常见的微生物, 与以前的研究一致。通过 MLST 分析了 20 个布氏弓形杆菌菌株, 确定了 81 个等位基因和 16 个 ST, 证明了 MLST 的高区分能力极其适用于流行病学调查^[48]。Marta 等发现在意大利南部从散装牛奶收集的 484 个样品中, 13.2% ($n=64$)存在杆状杆菌, 通过生化鉴定和测序分析出 4.1%为布氏弓形杆菌, 对布氏弓形杆菌使用 MLST 鉴定出 16 种不同的 ST, 其中 14 种(占 87.5%)以前未报道, 由于检测到的多数病原微生物具有遗传多样性, 使得在疫病调查中难以确定感染源^[49]。

3.2.3 限制性长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

RFLP 作为第一代 DNA 分子标记技术, 由人类遗传学家 Bostein 于 1980 年首次提出^[50], 时至今日仍被广泛应用于遗传图谱构建、生物进化的分类和研究、基因定位等领域。其基本原理为: 当 DNA 发生突变, 而且引起其酶切位点的个数发生变化, 此时用同一种限制性内切酶切割这些 DNA 片段会产生长度和数量均不同的限制性酶切片段, 将这些片段通过电泳和转膜及变性后, 与标记过的探针进行杂交和洗膜, 然后分析其多态性。

金黄色葡萄球菌是常见的食源性病原微生物, 可导致奶牛患乳房炎。奶牛乳腺炎是导致牛奶被污染的重要原因。Dendani 等在法国罗纳-阿尔卑斯地区的牛乳腺炎病牛收集了共 22 株金黄色葡萄球菌菌株, 采用 PCR 和 PCR-RFLP 评估凝固酶 Coagulase 基因(*coa*)多态性产生了 6 个分布图, 结果表明来自研究区域的奶牛被金黄色葡萄球菌菌株感染, 鉴定得到的结果与 PFGE 相同^[50]。基于 *coa* 基因的 PCR-RFLP 的鉴定已被认为是用于牛乳腺炎流行病

学研究更简单准确的分型方法,可为金黄色葡萄球菌提供更准确的可追溯性分析。Alni 等通过 RFLP 分析确定奶酪等样品中金黄色葡萄球菌分离株中 *coa* 基因的多态性,检测到 5 个不同的 RFLP 模式(I-V),每组主要存在一种模式类型,他们认为大多数分离株可能具有相同的起源^[51]。健康的奶牛才有可能生产出健康的牛奶,金黄色葡萄球菌属于主要的传染性乳腺炎病原微生物,确定金黄色葡萄球菌分离株之间的遗传关系对于这种细菌引起的感染的流行病学监测和控制很重要。

3.2.4 扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

AFLP 技术通过对基因组 DNA 进行限制性内切酶酶切,将人工合成的特定的双链接头连在这些片段两端,形成一个带接头的特异片段,用这些特异片段为扩增反应提供模板,通过接头序列和 PCR 引物 3'端选择性碱基的识别,对特异性片段进行选择扩增,即可完成菌株多态性的分析。

在具有手动和机械挤奶系统的 10 个奶牛场的挤奶过程中,评估 DNA 同源性和分离株之间的分布模式,以鉴定假单胞菌属牛奶污染的主要来源。Vidal 等分别从手动、机械挤奶系统奶牛场的 85、82 个采样点分离出 167 株假单胞菌属菌株,采用 AFLP 技术将模式分布在不同的农场和季节,不同农场的挤奶系统、不同季节均未观察到显著差异($P>0.05$),因此认为牛奶中假单胞菌属污染可能与挤奶者的手、奶牛乳头表面、奶杯、设备的污染有关^[52]。

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是一种广泛用于牛奶发酵过程中的乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)。Lazzi 等评估并比较了 AFLP 和随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)的指纹分辨率,总体数据表明通过 AFLP 进行的基因型表征可以更好地了解嗜热链球菌的微生物多样性,表明 RAPD 的区分度低于 AFLP^[53]。AFLP 分析在嗜热链球菌菌株鉴定中的成功应用表明,该技术可用于定义每个特定菌株的全

基因组多样性,作为截至目前使用的指纹方法的替代方法。

3.2.5 随机扩增多态性 DNA

RAPD 是美国学者 Williams 和 Welsh 于 1990 年首先提出的。RAPD 技术是以 8-10 bp 的随机寡核苷酸片段作为引物,对基因组进行 PCR 扩增,扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳(Agarose Gel Electrophoresis)或 PAGE 电泳检测研究 DNA 的多态性,已被成功地用于乳制品来源的判别细菌菌株,只需要少量 DNA 而无需有关 DNA 序列的信息^[54-55]。

奶粉的安全问题关系着婴儿的健康,一直以来都被人们高度关注。Sadiq 等评价了 25 家中国奶粉,根据 RAPD 图谱将分离出的 738 株菌株分成 30 多个组,认为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是最主要的细菌(约占分离菌总数的 43%),其次是嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermophilus*, 约占 21%),除 5 个未鉴定组外共鉴定出 19 种病原微生物,其中有 12 种以前在奶粉中未被报告过^[56]。Yuan 等从中国不同农场采集的奶样中分离出 480 株菌,通过 RAPD 和 16S rRNA 基因测序将病原微生物共分为 24 属 74 种,其中优势菌属假单胞菌属占有分离株 58.8%,其次是不动杆菌属(*Acinetobacter*, 占 13.3%)、黄杆菌(*Flavobacterium* sp., 占 6.0%)、鞘氨醇杆菌(*Sphingomonas*, 占 4.2%),在这些分离菌株中有 12.3%的微生物在以前的研究中从未被报道过,表明在生乳中对许多嗜冷菌的研究相当不足,在未来需要进行详细的调查,以确定这些细菌分离物对乳制品质量的影响^[57]。RAPD 能够对奶粉中的病原微生物进行准确的区分,通过比较污染样品和可能污染源中微生物 RAPD 图谱的差异就可以确定污染来源,进而达到溯源的目的。

3.2.6 变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

DGGE 的原理是通过在一般聚丙烯酰胺凝胶的基础上加入变性剂(尿素和甲酰胺),通过控制变性剂浓度,利用不同序列 DNA 解链区域与解链行为不一致的原理,达到对等长度但序列不同 DNA 片

段的分离。

大多数嗜冷菌具有产生耐热蛋白酶的能力, 这些蛋白酶会破坏牛奶和奶制品的质量。为了研究冷藏期间嗜冷菌的种群动态, Xin 等将 3 组牛奶样本(样本 A 包含北京 10 个农场的牛奶, 样本 B 包含黑河 5 个农场的牛奶, 样本 C 包含哈尔滨 7 个农场的牛奶)在 0–5 °C 和 5–10 °C 下冷藏, 采取 PCR-DGGE 分析表明储存后样品中主要的嗜冷菌为假单胞菌属, 而且细菌群落概况随地理位置和冷藏温度而变化, 在其中选择了 8 种嗜冷菌分离株评估了它们的生长和蛋白水解活性, 认为嗜冷菌与牛奶和乳制品的质量有重大关系^[58]。

Nalepa 等共使用了 73 个参考菌株, 并选择了代表 5 个细菌组(发酵细菌、非发酵细菌、粪便细菌、孢子形成细菌和致病细菌)的 24 个菌株来建立参考标记, 用于分析生乳和奶酪样品微生物区系, 通过 PCR-DGGE 方法对生乳和成熟奶酪中的微生物群进行定性评估, 在生乳中发现明串珠菌属(*Leuconostoc*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、发酵菌[弗氏乳杆菌(*Lactobacillus freundii*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)]和非发酵菌[发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)]在奶酪样品中存在较普遍, 在 MRS、M17 和 ML 培养基上培养的干酪中鉴定出大肠杆菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌, 该研究开发的标记物不需要条带分离、重新扩增、测序或序列鉴定, 从而减少了分析时间和成本^[59]。该方法能够准确地鉴定出大肠杆菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌, 通过比较与可能污染源的大肠杆菌、产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌是否一致, 就能追踪到传染源, 以达到溯源的目的。

4 全基因组测序(Whole Genome Sequencing, WGS)

WGS 的基本原理是利用超级计算机将分解成 2 kb 左右小片段的基因组 DNA 进行随机测序后, 与适量的 10 kb 克隆和细菌人工染色体(Bacterial

Artificial Chromosome, BAC)克隆的末端测序进行整合序列组装, 来完成对某生物体整个序列基因的测序。通过 WGS 可获得的最佳分型分辨率使得在暴发过程中甚至可以监测暴发菌株中发生的微小遗传变异, 从而追踪传播事件。

Parisi 等使用 WGS 方法分析了 10 株从牛乳样品中分离出的布氏弓形杆菌菌株的遗传多样性、毒力、抗生素耐药性, 结果证实了 WGS 在获得有关这种重要的食源性病原体的相关信息用以检测其毒力、抗生素耐药基因和进行基因分型方面非常有用^[60]。Butcher 等通过 WGS 研究发现因饮用生乳造成的 5 例 STEC O157 噬菌体感染病人与该牧场粪便样品中的菌株相同, 在此次因饮用生乳造成的感染暴发中, WGS 的使用提高了病例的确定性, 并为与英格兰西南部相关的 STEC O157 PT 21/28 stx2a 高致病性进化支提供了进一步的见解^[61]。郭清艳等从 2005–2006 年进口奶制品的原料和婴儿配方奶粉产品中分离出 49 株阪崎肠杆菌, 通过第 2 代测序获得了全基因组序列, 将 49 个分离株鉴定为 8 种不同的 ST, 其中 ST13 (65.3%, 32/49)是最主要的; WGS 不仅可以用于 MLST 分型, 还可以用于区分 16S rRNA 基因序列高度相似的菌株, 使病原微生物的分类更准确, 为受阪崎肠杆菌污染的奶制品提供更快的可追溯性分析^[62]。

尽管 WGS 在食品工业溯源中的使用越来越多, 但截至目前尚无已使用的标准或指南。Portmann 等根据稳定性、可重复性、可再现性、歧视能力(Discriminatory Power)、流行病学一致性标准, 对单核细胞增生李斯特菌和肠炎沙门氏菌的完整 WGS 工作流程(分离物的继代培养、DNA 提取、测序和生物信息学分析)进行了验证, 证明了 WGS 具有稳定性、可重复性、可再现性、歧视能力、与流行病学的一致性和很高的区分力, 同时也证明了 WGS 适用于追踪单核细胞增生李斯特氏菌和小肠链球菌^[63]。遗传数据的透明化、公开化有助于促进和加强各学科之间的交流与合作, 也有利于找出更

好的方法去更好地溯源。美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 与美国国家生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 联合开发了第一个分布式 WGS 网络, 创建了一个可公开获得的包括沙门氏菌在内的数千种食源性致病细菌的基因的全球数据库^[64]。随着测序成本的降低, 全基因组测序在食品安全上将发挥其巨大的潜力。

5 展望

随着经济全球化的深入, 食品经济也在以超乎寻常的速度更新换代。然而, 多样与便捷就意味着食品安全风险的增加。如今, 食品安全越来越受到人们的关注, 对食源性疾病原因和来源问责制的需求也日益增加。准确追踪特定致病性微生物在暴发过程中所经过的途径变得越来越重要。与传统的表型分析方法相比, 分子分型方法能够更稳定、更持久地为食品中致病性微生物的检测与研究提供可靠帮助。而且, 这类技术不囿于传统数据的支撑, 可根据微生物的进化过程快速进行技术更新, 及时完善 DNA 序列数据库, 为高频跨境危险性微生物风险评估、奶产品病原微生物风险评估以及国家监管机构工作和监管政策制定提供科学依据, 也将为双边贸易谈判、国门安全风险预警提供科技支撑, 为全体国民的健康提供强有力的保障。

REFERENCES

- [1] Artursson K, Schelin J, Lambertz ST, Hansson I, Engvall EO. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 284: 120-127
- [2] Zhang J, Jiang Y, Xia X, Wu J, Almeida R, Eda S, Qi HC. An on-site, highly specific immunosensor for *Escherichia coli* detection in field milk samples from mastitis-affected dairy cattle[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 165: 112366
- [3] Pacha PA, Munoz MA, Paredes-Osses E, Latorre AA. Short communication: virulence profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk and adherences on milking equipment on Chilean dairy farms[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 4732-4737
- [4] Kashoma IP, Kassem II, John J, Kessy BM, Gebreyes W, Kazwala RR, Rajashekara G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from dressed beef carcasses and raw milk in Tanzania[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2016, 22(1): 40-52
- [5] Modi S, Brahmabhatt MN, Chatur YA, Nayak JB. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram[J]. *Veterinary World*, 2015, 8(1): 1-8
- [6] Adzitey F, Asiamah P, Boateng EF. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* isolated from cow milk, milk products and hands of sellers in the Tamale Metropolis of Ghana[J]. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 2020, 24(1): 59-64
- [7] Rahman MA, Rahman AKMA, Islam MA, Alam MM. Detection of multi-drug resistant *Salmonella* from milk and meat in Bangladesh[J]. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2018, 16(1): 115-120
- [8] El-Baz AH, El-Sherbini M, Abdelkhalek A, Al-Ashmawy MA. Prevalence and molecular characterization of *Salmonella* serovars in milk and cheese in Mansoura city, Egypt[J]. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2017, 4(1): 45-51
- [9] Bano SA, Hayat M, Samreen T, Asif M, Habiba U, Uzair B. Detection of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. from raw milk samples of different cities of Pakistan[J]. *Natural Science*, 2020, 12(5): 295-306
- [10] Pei XY, Yang SR, Zhan L, Zhu JH, Song XY, Hu XN, Liu GH, Ma GZ, Li N, Yang DJ. Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China[J]. *Food Control*, 2018, 93: 101-105
- [11] Meng L, Zhang YD, Liu HM, Zhao SG, Wang JQ, Zheng N. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2158
- [12] Meng L, Liu HM, Dong L, Zheng N, Xing MR, Zhang YD, Zhao SG, Wang JQ. Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(4): 2897-2905
- [13] del Olmo A, Calzada J, Nuñez M. The blue discoloration of fresh cheeses: a worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Food Control*, 2018, 86: 359-366
- [14] Lan T, Liu HM, Meng L, Xing MR, Dong L, Gu M, Wang JQ, Zheng N. Antimicrobial susceptibility, phylotypes, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis in five provinces of China[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 406-423
- [15] Yong Y, Yu XF, Zhan L, Chen JC, Zhang YY, Zhang JY, Chen HH, Zhang Z, Zhang YJ, Lu YY, et al. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China[J]. *Food Microbiology*, 2017, 62: 46-50

- [16] Nucera DM, Lomonaco S, Morra P, Ortoffi MF, Giaccone D, Grassi MA. Dissemination and persistence of *Pseudomonas* spp. in small-scale dairy farms[J]. Italian Journal of Food Safety, 2016, 5(2): 5652
- [17] Viegas S, Assunção R, Twarużek M, Kosicki R, Grajewski J, Viegas C. Mycotoxins feed contamination in a dairy farm-potential implications for milk contamination and workers' exposure in a one health approach[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1118-1123
- [18] Fei P, Yuan XJ, Zhao SJ, Yang TX, Xiang JL, Chen X, Zhou LX, Ji MD. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from raw milk and cattle farm environments[J]. Current Microbiology, 2019, 76(11): 1355-1360
- [19] Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia[J]. BMC Veterinary Research, 2016. DOI: 10.1186/s12917-016-0905-3
- [20] Lee SHI, Barancelli GV, De Camargo TM, Corassin CH, Rosim RE, DaCruz AG, Cappato LP, De Oliveira CAF. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants[J]. Food Research International, 2017, 91: 88-91
- [21] Fei P, Man CX, Lou BB, Forsythe SJ, Chai YL, Li R, Niu JT, Jiang YJ. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5430-5439
- [22] Ntuli V, Njage PMK, Buys EM. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(12): 9534-9549
- [23] Liu HM, Li SL, Meng L, Dong L, Zhao SG, Lan XY, Wang JQ, Zheng N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(11): 8796-8803
- [24] Meng L, Liu HM, Lan T, Dong L, Hu HY, Zhao SG, Zhang YD, Zheng N, Wang JQ. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1005
- [25] Elshiekh NA, Mohammed G, Abdalla M, Elkhair O, Altayeb H. Isolation and molecular identification of *Staphylococcus species* in cow's milk distributed in Khartoum state[J]. The Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 2020, 51(2): 271-281
- [26] Tayyarcıan EK, Soykut EA, Boyacı IH. A Raman-spectroscopy-based approach for detection and discrimination of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* phages at low titer in raw milk[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(5): 627-636
- [27] Xie YF, Feng JJ, Yao WR, Guo YH, Cheng YL, Qian H. Method for rapidly detecting *Salmonella typhimurium* in milk by Raman microspectroscopy based on incorporation of heavy water: US, Patent application 15/815, 341[P]. 2019-02-14
- [28] Feng JJ, Yao WR, Guo YH, Cheng YL, Qian H, Xie YF. Incorporation of heavy water for rapid detection of *Salmonella typhimurium* by Raman microspectroscopy[J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(12): 3551-3557
- [29] De Koster CG, Brul S. MALDI-TOF MS identification and tracking of food spoilers and food-borne pathogens[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 10: 76-84
- [30] Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications of MALDI-TOF technology in clinical microbiology[J]. Pathologie Biologie, 2015, 63(1): 43-52
- [31] Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2015, 1854(6): 528-537
- [32] Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159730
- [33] Goldstein JE, Zhang L, Borrer CM, Rago JV, Sandrin TR. Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(2): 144-150
- [34] Rim JH, Lee YS, Hong SK, Park Y, Kim M, D'Souza R, Park ES, Yong D, Lee K. Insufficient discriminatory power of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry dendrograms to determine the clonality of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 535027
- [35] Lasch P, Fleige C, Stämmler M, Layer F, Nübel U, Witte W, Werner G. Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 100: 58-69
- [36] Hsueh PR, Lee TF, Du SH, Teng SH, Liao CH, Sheng WH, Teng LJ. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(7): 2371-2379
- [37] Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS

- fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2011, 301(1): 64-68
- [38] Sun JH. Application and development of PCR in the detection of food-borne microorganism[J]. Biological Chemical Engineering, 2016, 2(2): 56-58,63 (in Chinese)
孙吉浩. PCR 技术在食源性微生物检测中的应用与发展研究[J]. 生物化工, 2016, 2(2): 56-58,63
- [39] Demirci M, Yigin A, Altun SK, Uysal HK, Saribas S, Kocazeybek BS. *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. detection via multiplex real-time PCR and discrimination via MALDI-TOF MS in different animal raw milk samples[J]. Nigerian Journal of Clinical Practice, 2019, 22(8): 1083-1090
- [40] Hernández M, López-Enríquez L, Rodríguez-Lázaro D. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* by real-time PCR in raw milk[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(5): 1139-1147
- [41] Salvianti F, Costanza F, Sonnati G, Pinzani P. Detection and characterization of circulating tumor cells by quantitative real-time PCR[A]/Bassoni B, Raso A. Quantitative Real-Time PCR[M]. New York: Springer, 2020: 139-151
- [42] Wei CJ, Zhong JL, Hu T, Zhao XH. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk[J]. 3 Biotech, 2018, 8(1): 76
- [43] Ung A, Baidjoe AY, Van Cauteren D, Fawal N, Fabre L, Guerrisi C, Danis K, Morand A, Donguy MP, Lucas E, et al. Disentangling a complex nationwide *Salmonella* Dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016[J]. Eurosurveillance, 2019, 24(3): pii=1700703
- [44] Dal T, Durmaz R, Ceylan A, Bacalan F, Karagoz A, Celebi B, Yasar E, Kilic S, Acikgoz C. Molecular investigation of the transmission dynamics of brucellosis observed among children in the province of south-east Anatolia, Turkey[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2018, 11(3): e58857
- [45] Ma JY, Wang H, Zhang XF, Xu LQ, Hu GY, Jiang H, Zhao F, Zhao HY, Piao DR, Qin YM, et al. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China[J]. Infectious Diseases of Poverty, 2016, 5: 26
- [46] Singh M, Malik MA, Singh DK, Doimari S, Bhavna, Sharma R. Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)-typing of *Brucella abortus* isolates of India reveals limited genetic diversity[J]. Tropical Animal Health and Production, 2020, 52(3): 1187-1194
- [47] Ali S, Akhter S, Khan I, Ahmed H, Maalik A, Neubauer H, Melzer F, El-Adawy H. Molecular typing of *Brucella abortus* strains isolated from cattle in different districts of Pakistan based on Bruce-Ladder-PCR and MLVA-16 assays[J]. Pakistan Veterinary Journal, 2019, 39(3): 463-465
- [48] Caruso M, Latorre L, Santagada G, Fraccalvieri R, Difato LM, Miccolupo A, Capozzi L, Bonerba E, Mottola A, Parisi A. *Arcobacter* spp. in bovine milk: an emerging pathogen with potential zoonotic risk[J]. Italian Journal of Food Safety, 2019, 7(4): 7685
- [49] Marta C, Giovanni N, Angela M, Loredana C, Elisabetta B, Laura D, Anna M, Angela DP, Gianfranco S, Antonio P. Large genetic diversity of *Arcobacter butzleri* isolated from raw milk in southern Italy[J]. Food Microbiology, 2020, 89: 103403
- [50] Dendani ZC, Bezille P, Arcangioli MA. PCR and PCR-RFLP genotyping of *Staphylococcus aureus* coagulase gene: convenience compared to pulse-field gel electrophoresis[J]. Comparative Clinical Pathology, 2016, 25(5): 1061-1064
- [51] Alni RH, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P, Alikhani MY. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* coagulase gene using PCR-RFLP analysis[J]. Medical Laboratory Journal, 2017, 11(6): 12-17
- [52] Vidal AMC, Saran NA, Vaz ACN, Capodifoglio E, Gonçalves ACS, Rossi GAM, Figueiredo AS, Ruiz VLA. *Pseudomonas* spp.: contamination sources in bulk tanks of dairy farms[J]. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2017, 37(9): 941-948
- [53] Lazzi C, Bove CG, Sgarbi E, Monica G, La Gioia F, Sandra T, Neviani E. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(1): 48-54
- [54] Svensson B, Eneroth Å, Brendehaug J, Christiansson A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(12): 903-912
- [55] Singh KP. Analysis of toxicants-induced alterations in DNA methylation by methylation-sensitive-random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (MS-RAPD-PCR)[A]/Keohavong P, Singh KP, Gao WM. Molecular Toxicology Protocols[M]. New York: Springer, 2020: 213-224
- [56] Sadiq FA, Li Y, Liu TJ, Flint S, Zhang GH, He GQ. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 200-208
- [57] Yuan L, Sadiq FA, Liu TJ, Flint S, Chen JC, Yang HY, Gu JS, Zhang GH, He GQ. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk[J]. LWT, 2017, 84: 409-418
- [58] Xin L, Meng ZX, Zhang LW, Cui YH, Han X, Yi HX. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from north China[J]. International Dairy Journal, 2017, 66: 34-41
- [59] Nalepa B, Markiewicz LH. PCR-DGGE markers for qualitative profiling of microbiota in raw milk and ripened

- cheeses[J]. LWT, 2017, 84: 168-174
- [60] Parisi A, Capozzi L, Bianco A, Caruso M, Latorre L, Costa A, Giannico A, Ridolfi D, Bulzacchelli C, Santagada G. Identification of virulence and antibiotic resistance factors in *Arcobacter butzleri* isolated from bovine milk by whole genome sequencing[J]. Italian Journal of Food Safety, 2019, 8(2): 7840
- [61] Butcher H, Elson R, Chattaway MA, Featherstone CA, Willis C, Jorgensen F, Dallman TJ, Jenkins C, McLauchlin JJ, Beck CR, et al. Whole genome sequencing improved case ascertainment in an outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with raw drinking milk[J]. Epidemiology & Infection, 2016, 144(13): 2812-2823
- [62] Guo QY, Niu B, Yang JL. Application of whole genome sequencing (WGS) to *Cronobacter sakazakii* in dairy products, comparing two subtyping methods of MLST and SNP[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(8): 13-17,20 (in Chinese)
- 郭清艳, 钮冰, 杨捷琳. 两种分子分型技术在乳制品克诺罗杆菌污染溯源分析上的比较[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(8): 13-17,20
- [63] Portmann AC, Fournier C, Gimonet J, Ngom-Bru C, Barretto C, Baert L. A validation approach of an end-to-end whole genome sequencing workflow for source tracking of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 446
- [64] Allard MW, Bell R, Ferreira CM, Gonzalez-Escalona N, Hoffmann M, Muruvanda T, Ottesen A, Ramachandran P, Reed E, Sharma S, et al. Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 224-229