DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250821001
引用格式: 王增林, 李莹, 张涵, 等. 结合自动化成像设备与深度学习算法的数字化免疫分析系统检测牛奶中的恩诺沙星残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(8): 85–92.
WANG ZL, LI Y, ZHANG H, *et al*. Digital immunoassay system integrating automated imaging equipment with deep learning algorithms for detecting enrofloxacin residues [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(8): 85–92. (in Chinese with English abstract).

结合自动化成像设备与深度学习算法的数字化免疫分析系统检测牛奶中的恩诺沙星残留

王增林[1], 李　莹[2], 张　涵[3], 王慧慧[1], 夏　楠[3], 毛杜邦[1*], 陈翊平[2*]

(1. 大连工业大学机械工程与自动化学院, 大连　116034; 2. 大连工业大学食品学院, 大连　116034;
3. 大连工业大学信息与科学工程学院, 大连　116034)

摘　要: 目的　开发一种智能化、高灵敏的恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)快速检测平台, 以解决传统检测方法成本高、耗时长, 以及现有数字免疫分析技术依赖人工操作、识别准确性不足等问题。**方法**　基于自动化成像设备与深度学习算法, 构建以聚苯乙烯微球为信号载体的数字化免疫分析系统, 结合免疫反应与磁性分离技术实现定量检测。该系统集成高精度自动显微位移平台, 采用 Faster-RCNN 算法实现微球快速识别, 并引入 NAFNet 图像增强算法以提升成像质量。**结果**　该系统能够实现 ENR 的高灵敏度检测(检出限 19.35 pg/mL, 线性范围 0.5~100.0 ng/mL), 测试回收率为 104%~111%, 且在检测效率、自动化程度和抗干扰能力上均取得了显著突破。**结论**　。本研究构建了基于深度学习的自动化免疫检测平台, 可实现微球图像稳定采集与精准识别。深度学习算法计数准确可靠, 搭建的免疫检测体系线性范围宽、检出限低、灵敏度高, 在牛奶样品中检测效果良好, 适用于食品中恩诺沙星快速自动化检测。

关键词: 恩诺沙星; 数字化免疫分析系统; 聚苯乙烯微球; 深度学习

Digital immunoassay system integrating automated imaging equipment with deep learning algorithms for detecting enrofloxacin residues

WANG Zeng-Lin[1], LI Ying[2], ZHANG Han[3], WANG Hui-Hui[1], XIA Nan[3],
MAO Du-Bang[1*], CHEN Yi-Ping[2*]

(1. *School of Mechanical Engineering and Automation*, *Dalian Polytechnic University*, *Dalian* 116034, *China*; 2. *School of Food Science and Technology*, *Dalian Polytechnic University*, *Dalian* 116034, *China*; 3. *School of Information Science and Engineering*, *Dalian Polytechnic University*, *Dalian* 116034, *China*)

ABSTRACT: Objective　To develop an intelligent, highly sensitive rapid detection platform for enrofloxacin

收稿日期: 2025-08-21

第一作者: 王增林(1999—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: wangzl2417@163.com

***通信作者:** 毛杜邦(1988—), 男, 讲师, 主要研究方向为智能机器人、精密仪器、微驱动技术、智能控制技术等研究。E-mail: maodb@dlpu.edu.cn
陈翊平(1983—), 男, 教授, 主要研究方向为食品安全快速检测新理论及新技术研究, 食品加工与制造过程中风险因子阻抗技术的研究。E-mail: chenyp@dlpu.edu.cn

(ENR) to address the issues of high cost and lengthy processing times associated with traditional detection methods, as well as the reliance on manual operation and insufficient identification accuracy of existing digital immunoassay technologies. **Methods** Based on automated imaging equipment and deep learning algorithms, a digital immunoassay system using polystyrene microspheres as signal carriers was constructed, combining immunoreaction and magnetic separation technologies to achieve quantitative detection. The system integrated a high-precision automated microdisplacement platform, adopted the Faster-RCNN algorithm to achieve rapid recognition of microspheres, and introduced the NAFNet image enhancement algorithm to improve the imaging quality. **Results** The platform was capable of achieving high sensitivity detection of ENR (limit of detection 19.35 pg/ml, linear range 0.5–100.0 ng/mL), with test recoveries ranging from 104%–111%, and had made significant breakthroughs in detection efficiency, automation and anti-interference capability. **Conclusion** The study develops a deep learning-based automated immunoassay platform capable of stable image acquisition and accurate recognition of microspheres. The deep learning algorithm provides accurate and reliable counting, and the immunoassay system establishes features a wide linear range, low detection limit and high sensitivity. It performs well in the detection of milk samples and is suitable for the rapid automated detection of enrofloxacin in food.

KEY WORDS: enrofloxacin; digital immunoassay system; polystyrene microspheres; deep learning

0 引 言

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)作为第三代氟喹诺酮类广谱抗生素, 广泛应用于动物治疗及水产、禽类和家畜养殖等领域[1–4], 它能够有效治疗由细菌引起的各种感染性疾病, 提高养殖业的生产效益, 具有显著的经济价值。一些商家企业过度追求经济效益滥用 ENR 导致引发了全球公共卫生问题, 其在食品中残留对人类健康构成了潜在威胁[5–6], 长期食用含有 ENR 残留的肉类、奶制品或蛋类食品可能对人体造成诸如过敏反应、肝脏毒性以及肠道菌群紊乱等健康问题[7]。此外, ENR 作为抗生素之一, 其残留可能促进生物抗药性基因的积累, 进而加剧抗生素耐药性(antimicrobial resistance, AMR)问题, 进一步威胁到公共卫生安全[8–9]。因此, 许多国家已对 ENR 在产品中的残留量设定了严格标准: 欧盟规定, 兽药产品中喹诺酮类药物的最大残留量为 100 μg/kg, 而 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》, ENR 在兽药残留中的限量为 100~300 μg/kg。因此高效快速检测食品中 ENR 的含量是食品安全领域一项非常重要的研究课题。

目前常用的 ENR 检测方法有色谱技术[如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱-质谱法(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)][10–11]、免疫化学技术[如酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)][12–13], 这些方法准确性好, 检测范围广, 但是检测成本高、时间长、样品前处理复杂, 难以实现现场快速灵敏检测。数字免疫分析(digital immunoassay, DIA)是一种通过计数标记物的个数来实现目标分子定量检测的方法[14], 由于其具有较强的抗干扰能力, 能够实现高灵敏度和高准确度的检测[15]。由于传统的数字免疫分析技术依赖的荧光标记[16]或纳米颗粒标记物[17–18]的合成、功能化和稳定性问题可能影响最终检测结果的准确性和重复性。

聚苯乙烯(polystyrene microspheres, PS)微球具有成本低、稳定性好及易于修饰等优势, 可作为理想的信号检测探针[19–20]; 此外, 显微镜可以准确识别 PS 微球的多维特征, 例如大小、数量、颜色等, 能够实现对多种生物标志物的多重编码检测[21–22]。但是传统显微镜在实际应用中依赖于人工计数和操作, 存在主观性强、采集效率低、准确性差等问题, 不利于快速准确实现检测目的。

将 PS 微球作为光学探针与人工智能技术相结合, 为分析复杂数据和实现自动化提供了新的解决方案[23]。传统的计算机视觉的目标识别算法往往依赖于边缘检测、阈值分割、形态学处理和轮廓提取等方法[24–25], 这些方法虽然计算成本较低, 但在面对目标物重叠遮挡、噪声、光照不均及模糊等复杂场景时, 识别准确率和鲁棒性不足成为该技术向高精度、智能化方向发展的技术瓶颈[26]。

为解决上述问题, 本研究以功能化 PS 微球作为信号载体, 表面偶联 ENR 的完全抗原(PS_{6000}-BSA-ENR), 磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNP)作为磁分离载体, 表面偶联 ENR 特异性抗体(MNP_{150}-Ab-ENR), 过诱导免疫磁颗粒, 微球信号探针与待测目标物之间产生竞争性免疫反应, 最后通过磁分离后复合物中结合磁颗粒的微球探针数量变化检测待测物浓度, 因此, 本研究设计了高精度自动化显微位移平台(图 1A)。该平台采用步进电机与同步带传动机构, 控制载物台在 X/Y 方向精确移动, 配合定制化控制软件, 可实现预设视野的连续自动采集, 减少人工操作误差。该平台赋予系统全自动连续成像能力, 为大规模样本检测提供硬件支撑(图 1B)。此外, 本研究引入基于深度学习的目标检测算法—Faster-RCNN[27] , 对微球的快速准确识别(图 1C)。最后, 针对显微成像中因平台运动或焦距偏移导致的运动模糊与非聚焦模糊问题, 本研究提出基于 NAFNet 的图像增强算法[28] 该算法采用简单门控操作和简化通道

注意力(simplified channel attention, SCA)代替传统的非线性激活函数，以期有效提升图像信噪比与清晰度，为 Faster-RCNN 精准识别计数提供了可靠的数据预处理保障。

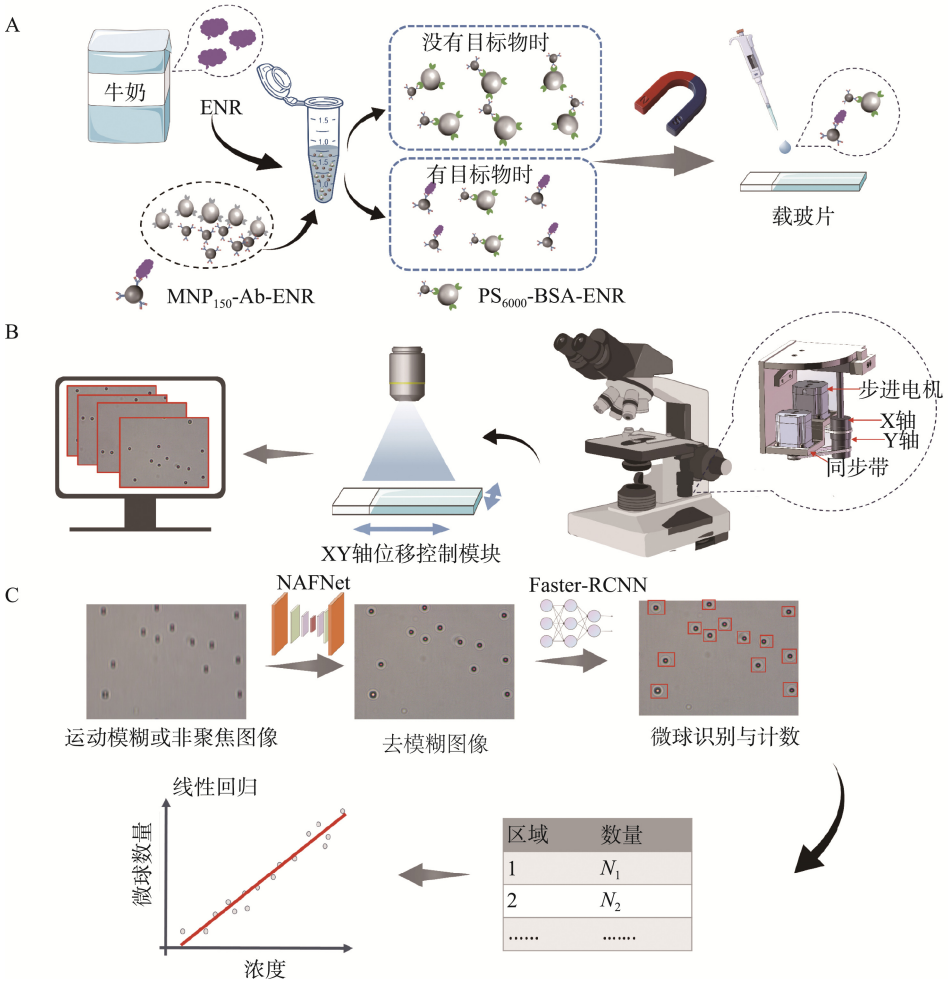
本研究将免疫反应信号载体—PS 微球转化为可自动化、智能化的图像信息，构建了结合自动化成像设备与深度学习算法的数字化免疫分析系统(automated imaging and deep-learning-based immunoassay system, AIDS)，为 ENR 残留检测提供了一种高效的解决方案，对推动食品检测领域的智能化转型升级具有重要的实践意义。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

牛奶样品购于超市。

羧基修饰的 PS 微球(质量浓度 100 mg/mL, 直径为 6 μm)(美国 Bangs Laboratories 公司); 羧基修饰的 150 nm 磁颗粒、磁分离架(美国 Ocean NanoTech 公司); ENR 完全抗体(ENR-Ab, 质量浓度 5 mg/mL)、ENR 抗原(BSA-ENR, 质量浓度 8 mg/mL)(山东蓝都生物科技有限公司); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(ethyldimethylaminopropyl carbodiimide, EDC, 纯度 98%)、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS, 纯度 98%)、2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulphonic acid, MES, 纯度 99%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 牛血清蛋白(bovine albumin, BSA)、吐温-20(美国 Amresco 公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4)、磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST, 0.01 mol/L, 含 0.05% 吐温-20)、2-吗啉乙磺酸吐温缓冲液(2-morpholinoethanesulphonic acid with Tween 20, MEST, 0.01 mol/L, 含 0.05% 吐温-20)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标羊抗鼠、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色液(上海碧云天生物技术有限公司)。



注: A. 恩诺沙星检测的竞争性免疫反应过程; B. 自动显微镜位移模块装置图和图像采集过程; C. 基于深度学习的微球图像增强和识别计数过程。

图 1　检测牛奶样品中恩诺沙星的免疫传感器反应原理示意图

Fig.1　Schematic illustration of immunosensor for detection of enrofloxacin in milk samples

1.2 仪器与设备

YM50PTF 普通光学显微镜(天津创立得科技有限公司); 57CM13 步进电机、DM542 步进电机驱动器(深圳雷赛智能控制有限公司); LRS-200-24|24V8.8A 开关电源[明纬(广州)电子有限公司]; ZMC304X 运动控制器(深圳市正运动技术); HTD285-3M-6mm, HTD225-3M-6mm 同步带、HTPA24S3M060-A-P6.35 同步带轮[米思米(中国)精密机械贸易有限公司]; ME104 分析天平(精度 0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多公司)。

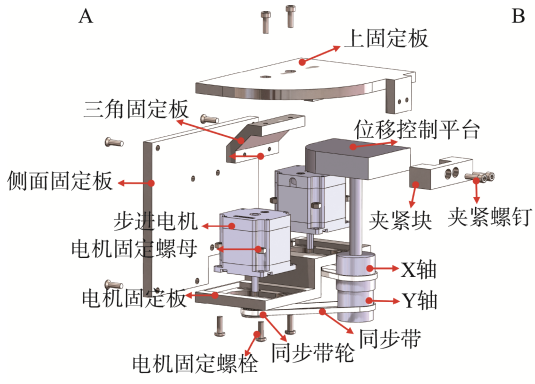
1.3 实验方法

1.3.1 PS_{6000}-BSA-ENR 和 MNP_{150}-Ab-ENR 的制备

取 1 mg PS_{6000} 溶液 1 mg 于 1.5 mL 离心管中, 离心(8000 r/min, 4 ℃, 25 min)并使用 MEST 洗涤 3 次, 以去除 PS 微球表面的非特异性吸附; 分别取 20 μL 10 mg/mL 的 EDC 溶液和 10 μL 10 mg/mL 的 NHS 溶液加入上述 PS 微球溶液中, 在 37 ℃下缓慢旋转混匀 20 min, 活化 PS 微球表面的羧基后以 8000 r/min 离心 25 min 并用 MEST 洗涤 3 次; 加入 250 μL PBS 和 250 μL PBST, 并在离心管中加入 10 μg ENR 完全抗体, 37 ℃下偶联 3 h; 偶联完成后, 以 8000 r/min 离心 25 min, 去除上清液, 加入 500 μL 含 1% BSA 的 PBST 缓冲液, 37 ℃反应 30 min, 封闭微球表面多余的位点; 最后以 8000 r/min 离心 25 min, 洗涤 3 次, 使用 PBS 将 PS_{6000}-BSA-ENR 定容至 1 mL, 重悬, 4 ℃保存。MNP_{150} 偶联 ENR 抗体的方式与 PS_{6000} 偶联方式相似, 不同之处在于磁分离步骤代替离心。

1.3.2 自动化成像设备

自动化位移控制模块由步进电机、步进电机驱动器、ZMC304X 控制器、电机座、夹紧块、三角固定板、侧板和上板组成。夹紧块两个面与载物台接触, 并通过螺钉调节夹紧块的松紧程度; 步进电机通过螺钉和螺母固定在电机座的长条孔内, 通过改变电机在长条孔的位置实现同步带的张紧, 三角固定板提供结构支撑增强运动稳定性(图 2A 和图 2B)。



控制程序基于 C#开发的 Winform 上位机界面, 与 ZMC304X 运动控制器实现交互, 可以实现点动和寸动控制、自动扫描及运动坐标反馈等功能。样品可以通过绝对坐标模式定位至设定位置, 或通过相对坐标模式按照特定步长移动。在自动扫描模式下, 样品可移动至预设的 9 个坐标位置进行图像采集。

为了抑制模块运动过程中产生的机械振动, 运动过程采用七段式 S 型加速曲线算法: 加加速—匀加速—减加速—匀速—加减速—匀减速—减减, 该设计兼顾快速启停需求, 同时最大限度地降低了加速度突变对平台造成的冲击[29]。

1.3.3 AIDS 检测 ENR 步骤

取 20 μL 使用 PBS 稀释的 MNP_{150}-Ab-ENR 和 PS_{6000}-BSA-ENR 偶联物, 20 μL 不同浓度的 ENR 于 1.5 mL 离心管中, 重悬, 37 ℃反应 30 min, 反应完成后磁分离 5 min 并弃掉上清液, 使用 MEST 洗涤 3 次, 最终使用 60 μL PBS 重悬复合物, 待测。

将待测复合物超声混匀 5 min, 并取 10 μL 滴加在载玻片上并盖上盖玻片, 静置 5 min, 置于 10×物镜的光学显微镜下观察, 使用自主开发的 Winform 上位机软件对自动化位移模块按照 1.3.2 步骤进行控制, 将采集到的图像输入到 Faster-RCNN 网络中进行识别计数, 并对图像中微球的数量进行加和, 每组实验重复 3 次, 计算平均值及标准偏差。

1.4 数据处理

使用 NAFNet 深度学习网络对显微镜微球图像进行预处理, 处理后的图像输入 Faster-RCNN 深度学习网络模型对微球进行计数加和(Pytorch 版本: 1.11.0; Python 版本: 3.8; CUDA 版本 11.3)。

所有实验均重复 3 次, 实验结果以平均值±标准偏差表示; 采用 Microsoft Excel Plus 2019 软件进行数据统计并制作表格, 并采用 Origin 2024 软件及 Python 3.9.21 (Matplotlib 库版本: 3.9.4)进行制图。

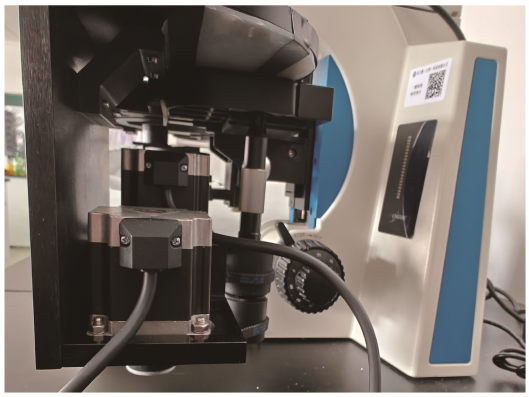


图 2 自动化成像设备的机械结构

Fig.2 Mechanical structure of automated imaging equipment

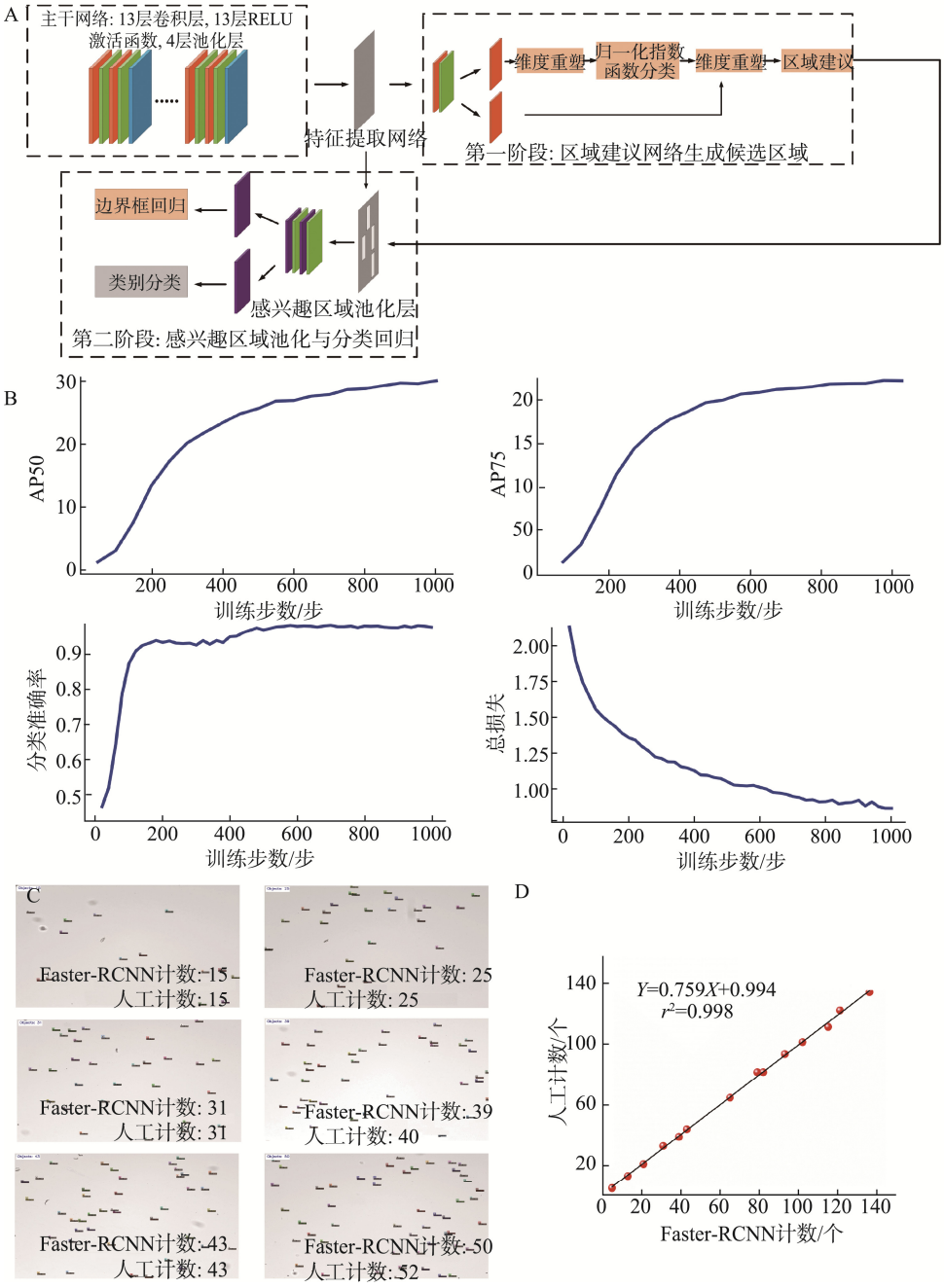
2　结果与分析

2.1　Faster-RCNN 的检测原理和准确性评估

为了实现高效而准确的微球识别计数, 通过引入了基于卷积神经网络—Faster-RCNN 进行识别计数, 该网络的检测步骤和原理如图 3A 所示。

将 450 张不同浓度的微球图像按照张数比 8:2 分为训练集和测试集, 经过 1000 轮训练后, 在测试集中模型检测指标如图 3B 所示, 其中, AP50 指预测框与真实框重叠面积超过 50%即判为正确, AP75 则要求重叠面积超过 75%; 模型的分类准确率达 96.8%。

为了更进一步地该算法对微球计数地适用性, 制备了各个浓度的样品, 随机进行测试, 与人工计数方法进行结果对比(图 3C), 并对两组结果进行线性拟合, 其线性方程: Y=0.759X+0.994, 其中 r^2=0.998(图 3D), 证明通过 Faster-RCNN 网络, 能够准确地实现微球的识别统计, 大大地提升了分析检测速度。



注: A. Faster-RCNN 的网络结构图; B. 在测试集中的训练结果; C. 人工计数与 Faster-RCNN 方法识别结果对比; D. 人工计数与 Faster-RCNN 计数之间的相关性分析。修正线性单元(rectified linear unit, RELU)。

图 3　Faster-RCNN 微球识别计数网络

Fig.3　Faster-RCNN microsphere recognition counting network

2.2 基于 NAFNet 微球图像去模糊算法

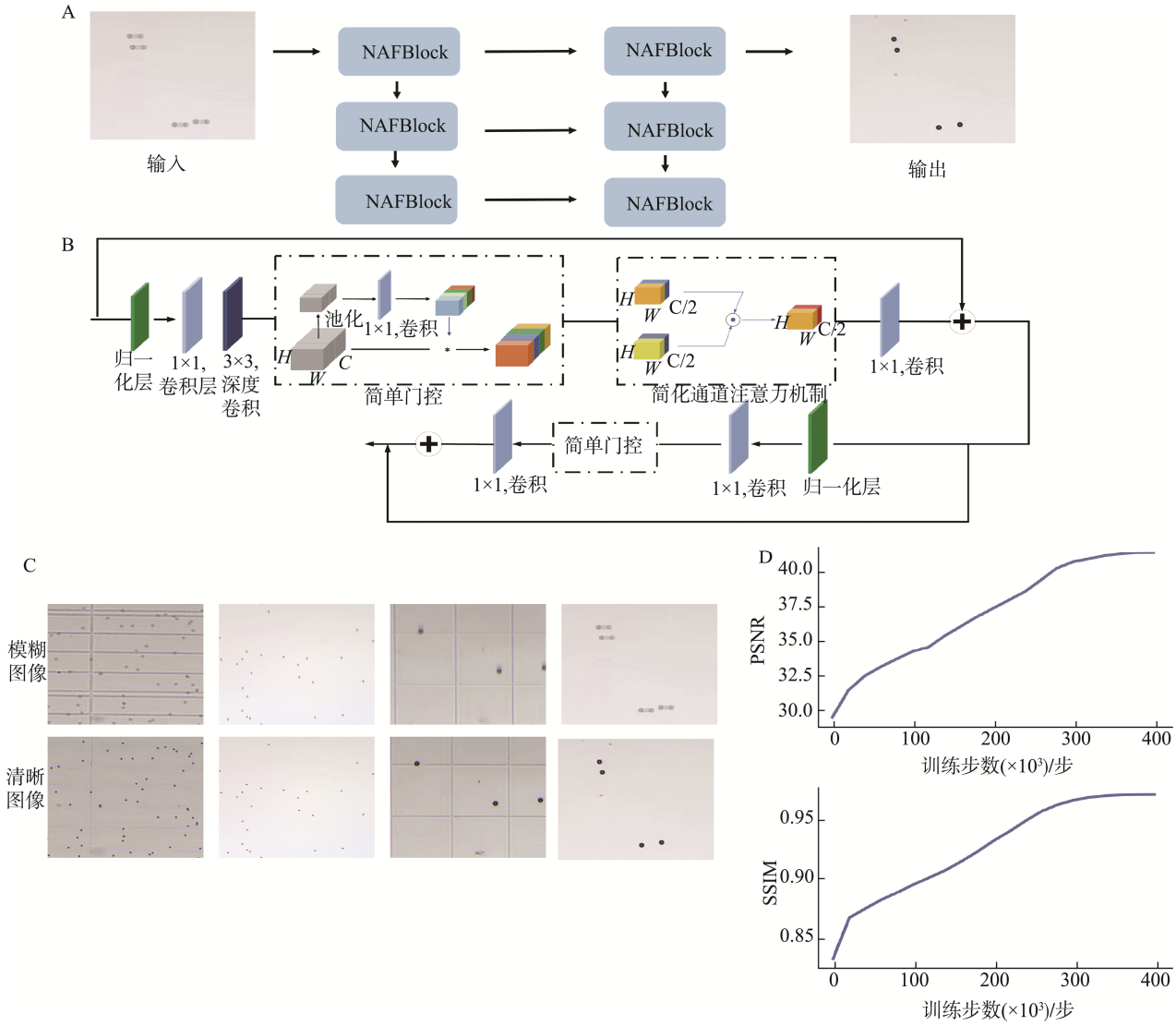
在自动化位移模块运动的过程中，会产生两种类型的模糊图像：一种是由于相机曝光时间问题产生的运动模糊；另一种是由于运动过程中平台不稳定造成的焦距偏移(非聚焦模糊)，造成成像质量下降，严重影响 Faster-RCNN 网络的识别效果和准确性。

NAFNet 是一种基于 U-Net 架构的图像恢复网络，其核心 NAFBlock 模块通过简单门控操作和简化通道注意力机制替代传统激活函数，有效降低计算复杂度并提升恢复效率(图 4A 和图 4B)。通过采集了微球在动态场景下和非聚焦场景下的模糊与清晰图像对，并将其划分为训练集(1446 对)和测试集(370 对)，此外通过引入峰值信噪比(peak signal-to-noise ratio, PNSR)和结构相似性(structure similarity index measure, SSIM)作为评价指标。

在训练过程中，优化器采用 AdamW，初始学习率为 0.001，采用余弦退火策略，平滑衰减到 1e-7，迭代次数为 400000，数据裁剪为 256×256，数据增强策略包括随机旋转(0°~90°)、水平翻转及噪声注入。经过训练后，测试集中的 SSIM 为 0.9704 db，PNSR 为 41.3788 db，为后续目标识别与计数奠定了基础(图 4C 和图 4D)。

2.3 ENR 检测

使用 PS_{6000} 作为信号探针，MNP_{150} 作为磁分离载体，实现了 ENR 的定量检测。首先，采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察免疫复合物(图 5)。大量的 MNP_{150} 结合到 PS 微球的表面，表明 PS_{6000}-BSA-ENR 和 MNP_{150}-Ab-ENR 成功偶联。



注：A. NAFNet 的 U-Net 结构；B. NAFBlock 网络结构；C. NAFNet 在测试集中的图像恢复效果；D. 训练结果 PSNR 和 SSIM。输入的特征图(维度为 $C\times H\times W$，即通道数×高×宽)。

图 4 NAFNet 微球图像去增强算法

Fig.4 NAFNet microsphere image de-enhancement algorithm

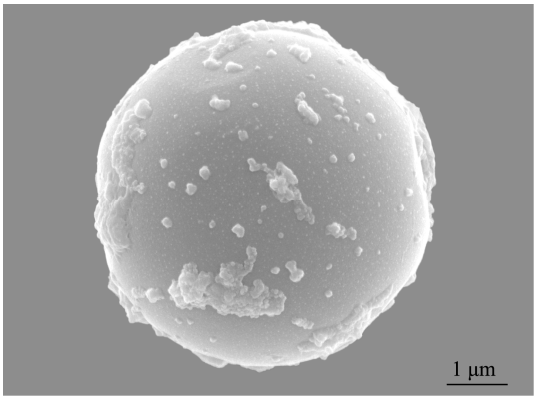


图 5　免疫复合物的 SEM 图像
Fig.5　SEM image of the immune complex

然后，对 PS_{6000}-BSA-ENR 偶联物的浓度、MNP_{150}-Ab-ENR 的浓度和反应时间进行了优化，最终确定为 60 μg/mL, 40 μg/mL, 30 min。

在上述最优条件下，进行定量检测 ENR。在 0.50~100.00 ng/mL 质量浓度范围内，得到了其标准曲线 Y=273.789–38.912X (r^2=0.995)，如图 6A 和图 6B 所示，检出限(limit of detection, LOD)采用公式(1)进行计算:

$$\mathrm{LOD}=\sigma+3s \quad (1)$$

式中: σ 为空白样品的平均值(n=10)，s 为空白样品的标准偏差[30]，计算得 LOD 值为 19.35 pg/mL。

此外，为了探究此方法对 ENR 检测的特异性，排除基质干扰对该检测方法的影响，分别测试了其他 3 种喹诺酮类抗生素类药物包括诺氟沙星(norfloxacin, Nor)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)和左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)，并设置空白组(Blank)，质量浓度设为 100 ng/mL，如图 6C 所示，所构建的检测方法只对 ENR 有响应，证明了该检测方法对 ENR 具有良好的特异性，干扰药物对信号输出的影响几乎可以忽略不计。

为了评估此分析方法的实际应用能力，在牛奶样品中依次加入 1、10、100 ng/mL 的 ENR 溶液进行检测。结果显示(表 1)，其加标回收率在 104%~111%，相对标准偏差在 17.68%~23.06%，说明方法准确可靠。

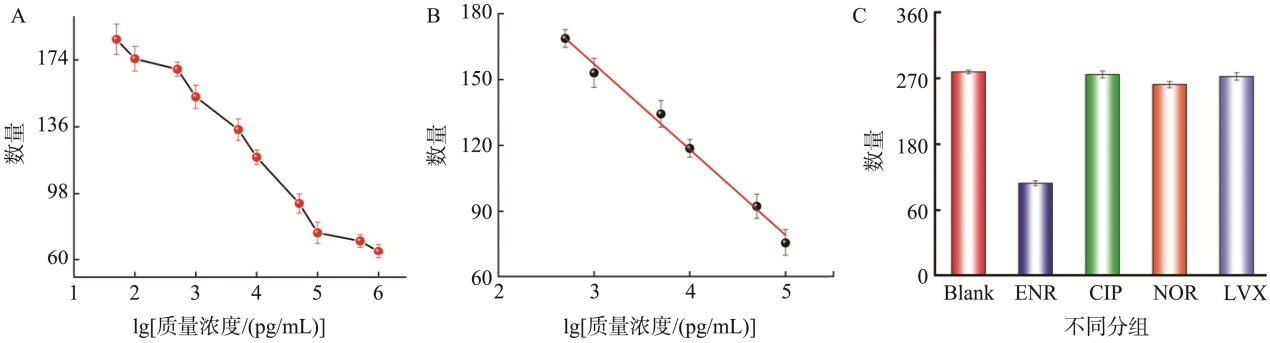


图 6　检测 ENR 的标准曲线(A)、检测 ENR 的线性范围(B)与 ENR 检测的特异性实验(C) (n=3)
Fig.6　Standard curves for ENR detection (A), linear range for detection of ENR (B) and specificity assay for ENR detection (C) (n=3)

表 1　牛奶中恩诺沙星的加标回收率(n=3)
Table 1　Spiked recovery rates of enrofloxacin in milk (n=3)

加标质量浓度/(ng/mL)	回收质量浓度/(ng/mL)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1	1.11±0.26	111	23.06
10	10.41±2.06	104	19.83
100	108.68±15.69	108	17.68

3　结　论

本研究针对 ENR 残留检测中传统方法和现有数字化免疫分析技术的局限性，成功开发了一种结合自动化成像设备与深度学习算法的 AIDS 平台。首先利用 PS 微球与 MNP 构建了竞争性数字化免疫反应体系，实现 ENR 的定量检测；同时开发了自动化显微位移平台，实现了高通量、连续精确的图像采集，结合 NAFNet 图像增强算法有效克服了成像过程中的模糊问题，提升了图像的质量；此外，引入基于 Faster-RCNN 的目标检测算法，实现了对微球目标物的快速准确识别计数。

实验结果表明，AIDS 平台不仅实现了 ENR 的高灵敏度、高通量和自动化检测，更在检测效率和抗干扰能力上取得突破。本研究为 ENR 残留的高效检测提供了一种创新解决方案，具有重要的实践意义。

参考文献

[1] ZHOU X, WANG X, SHANG L. Ratiometric fluorescence and visual sensing of ATP based on gold nanocluster-encapsulated metal-organic framework with a smartphone [J]. Chinese Chemical Letters, 2023, 34(8): 108093.

[2] PU Q, WANG C, YIN X, *et al*. A ratiometric fluorescent dark box and smartphone integrated portable sensing platform based on hydrogen bonding induction for on-site determination of enrofloxacin [J]. Food Chemistry, 2024, 455: 139876.

[3] WANG W, ZHANG L, DONG W, *et al*. A colorimetric aptasensor fabricated with group-specific split aptamers and complex nanozyme for

enrofloxacin and ciprofloxacin determination [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 458: 131995.

[4] JIN X, LIU S, ZHANG Z, *et al.* Enrofloxacin-induced transfer of multiple-antibiotic resistance genes and emergence of novel resistant bacteria in red swamp crayfish guts and pond sediments [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 443: 130261.

[5] BHATT S, CHATTERJEE S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation–A comprehensive review [J]. Environmental Pollution, 2022, 315: 120440.·

[6] LARSSON DGJ, FLACH CF. Antibiotic resistance in the environment [J]. Nature Reviews: Microbiology 2022, 20(5): 257–269.

[7] QIU W, LIU T, LIU X, *et al.* Enrofloxacin induces intestinal microbiota-mediated immunosuppression in Zebrafish [J]. Environmental Science Technology., 2022, 56(12): 8428–8437.

[8] DONG Y, ZHANG Y, LIU P, *et al*. A metal-organic framework signaling probe-mediated immunosensor for the economical and rapid determination of enrofloxacin in milk [J]. Food Chemistry, 2024, 449: 139050.

[9] MURRAY CJL, IKUTA KS, SHARARA F, *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis [J]. The Lancet, 2022, 399(10325): 629–655.

[10] FUNDADOR EOV, AMARGO MMS, FUNDADOR NGV. SALLE-HPLC-FLD variant protocols for the analysis of enrofloxacin/ciprofloxacin in chicken [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2025, 143: 107598.

[11] PANZENHAGEN PHN, AGUIAR WS, GOUVÊA R, *et al*. Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016, 33(4): 639–643.

[12] ZHAO C, PAN B, WANG M, *et al*. Improving the sensitivity of nanofibrous membrane-based ELISA for on-site antibiotics detection [J]. ACS Sensors, 2022, 7(5): 1458–1466.

[13] YANG M, XU Q, GU K, *et al*. Development of a nanobody-horseradish peroxidase fusion-based competitive ELISA to rapidly and sensitively detect Enrofloxacin residues in animal-derived foods [J]. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular Spectroscopy, 2025, 327: 125309.

[14] GONG F, TAN Z, SHAN X, *et al.* A facile strategy for multiplex protein detection by a fluorescent microsphere-based digital immunoassay [J]. Analytical Chemistry., 2024, 96(8): 3517–3524.

[15] CHAI Y, HU X, FANG Q, *et al.* Embracing poisson encapsulation statistics for improved droplet digital immunoassay [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(1): 444–453.

[16] WU Z, ZENG T, GUO WJ, *et al*. Digital single virus immunoassay for ultrasensitive multiplex avian influenza virus detection based on fluorescent magnetic multifunctional nanospheres [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(6): 5762–5770.

[17] ZHOU X, YANG CT, XU Q, *et al*. Gold nanoparticle probe-assisted antigen-counting chip using SEM [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(7): 6769–6776.

[18] CHE C, LI N, LONG KD, *et al*. Activate capture and digital counting (AC+DC) assay for protein biomarker detection integrated with a self-powered microfluidic cartridge [J]. Lab on a Chip, 2019, 19(23): 3943–3953.

[19] NIE R, HE H, LU P, *et al*. A homogeneous microchannel resistance sensor based on target-induced aggregation of polystyrene microspheres [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022, 369: 132277.

[20] UNCITI-BROCETA A, JOHANSSON EMV, YUSOP RM, *et al.* Synthesis of polystyrene microspheres and functionalization with Pd0 nanoparticles to perform bioorthogonal organometallic chemistry in living cells [J]. Nature Protocols., 2012, 7(6): 1207–1218.

[21] ZHAO W, ZHOU Y, FENG YZ, *et al*. Computer vision-based artificial intelligence-mediated encoding-decoding for multiplexed microfluidic digital immunoassay [J]. ACS Nano, 2023, 17(14): 13700–13714.

[22] FENG N, WANG S, WEI L, *et al*. Artificial intelligence-based imaging transcoding system for multiplex screening of viable foodborne pathogens [J]. Analytical Chemistry., 2023, 95(22): 8649–8659.

[23] ZHOU Y, ZHAO J, CHEN R, *et al*. A portable deep-learning-assisted digital single-particle counting biosensing platform for amplification-free nucleic acid detection using a lens-free holography microscope [J]. Nano Today, 2024, 56: 102238.

[24] ZHOU Y, ZHAO W, FENG Y, *et al.* Artificial intelligence-assisted digital immunoassay based on a programmable-particle-decoding technique for multitarget ultrasensitive detection [J]. Analytical Chemistry., 2022, 95(2): 1589–1598.

[25] SONG Y, SANDFORD E, TIAN Y, *et al*. Rapid single-molecule digital detection of protein biomarkers for continuous monitoring of systemic immune disorders [J]. Blood, 2021, 137(12): 1591–1602.

[26] SONG Y, ZHAO J, CAI T, *et al*. Machine learning-based cytokine microarray digital immunoassay analysis [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 180: 113088

[27] REN S, HE K, GIRSHICK R, *et al.* Faster R-CNN: Towards real-time object detection with region proposal networks [A]. arXiv, 2016.

[28] CHEN L, CHU X, ZHANG X, *et al.* Simple baselines for image restoration [A]. arXiv, 2022.

[29] LUO H, ZHAO D, FU W. Speed planning algorithm based on improved S-type acceleration and deceleration model [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Science), 2021, 26(6): 786–793.

[30] PARK B, LEE B, KIM KH, *et al*. A single-step, digital immunoassay based on serial imaging and image processing [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 410: 135670.

(责任编辑：韩晓红 蔡世佳)