DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260325004
引用格式: 周从宇, 姚家祥, 黎少毅, 等. 霍乱弧菌核酸检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(14): 202–212.
Zhou Congyu, Yao Jiaxiang, Li Shaoyi, et al. Research progress on nucleic acid detection technology for *Vibrio cholerae* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(14): 202–212. (in Chinese with English abstract).

霍乱弧菌核酸检测技术研究进展

周从宇*, 姚家祥, 黎少毅, 黄守忠, 罗 婷, 卢 璐, 王 娴
[六安市金安区疾病预防控制中心(区卫生监督所), 六安 237000]

摘 要: 霍乱是由霍乱弧菌引起的烈性肠道传染病, 快速、准确识别病原体是疫情早期预警和应急处置的关键。本文系统综述近年来霍乱弧菌核酸检测技术的研究进展, 重点梳理聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术和等温扩增技术的检测原理、技术特性与应用现状。通过构建核心性能综合对比表, 实现多维度横向评价; 深入剖析霍乱弧菌活菌不可培养状态检测、死菌 DNA 假阳性干扰、复杂基质抑制等当前领域关键共性问题, 并总结现有解决方案。结合临床诊断、现场应急、实验室精准检测等实际需求, 提出场景化技术选择建议: 实时荧光定量 PCR 技术为临床与实验室检测的金标准, 环介导等温扩增技术、重组酶聚合酶扩增技术适配现场快速检测, 微滴式数字 PCR 适用于精准定量及低载量样本确证。展望未来, 霍乱弧菌核酸检测将向“单氮化丙啶活菌鉴别+等温扩增+微流控集成+多靶标联检+智能判读”的一体化平台发展, 实现更快速、精准、便携的检测, 全面契合公共卫生防控实际需求。

关键词: 霍乱弧菌; 核酸检测; 聚合酶链式反应; 等温扩增
中图分类号: TS207.4; R155.5 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)14–0202–11

Research progress on nucleic acid detection technology for *Vibrio cholerae*

ZHOU Cong-Yu*, YAO Jia-Xiang, LI Shao-Yi, HUANG Shou-Zhong, LUO Ting, LU Lu, WANG Xian
[*Jin'an District Centre for Disease Control and Prevention* (*District Health Supervision Institute*), *Lu'an* 237000, *China*]

ABSTRACT: Cholera is a severe intestinal infectious disease caused by *Vibrio cholerae*. Rapid and accurate identification of the pathogen is critical for early warning of outbreaks and emergency response. This review systematically examined recent advances in nucleic acid detection technologies for *Vibrio cholerae*, focused on the detection principles, technical characteristics and current applications of polymerase chain reaction (PCR) and isothermal amplification techniques, constructed a comprehensive performance comparison table to enable multi-dimensional comparative evaluation; thoroughly analyzed key common challenges in the field, including detection of viable but non-culturable *Vibrio cholerae*, false-positive interference from dead bacterial DNA, complex matrix inhibition and summarized existing solutions. Based on practical requirements in clinical diagnosis, on-site emergency testing and laboratory-based precision detection, this review proposed scenario-specific technical recommendations: real-time fluorescent quantitative PCR serves as the gold standard for clinical and laboratory testing; loop-mediated

收稿日期: 2026-03-25
第一作者/*通信作者: 周从宇(1993—), 女, 硕士, 副主任检验师, 主要研究方向为卫生检验检测。E-mail: 1406270245@qq.com

isothermal amplification and recombinase polymerase amplification were suitable for rapid on-site detection; and droplet digital PCR was applicable to precise quantification and confirmation of low-load samples. Looking ahead, *Vibrio cholerae* nucleic acid detection will evolve toward an integrated platform combining propidium monoazide-based viable bacteria discrimination, isothermal amplification, microfluidic integration, multi-target combined detection and intelligent interpretation, thereby enabling faster, more accurate and portable testing that fully meets the practical needs of public health prevention and control.

KEY WORDS: *Vibrio cholerae*; nucleic acid detection; polymerase chain reaction; isothermal amplification

0　引　言

霍乱是由霍乱弧菌所致的烈性肠道传染病, 属于我国法定甲类传染病与国际检疫传染病, 具有发病急、传播速度快、病情进展迅猛、致死率高的特点, 全球公共卫生防控形势严峻。据流行病学统计, 全球年均新发霍乱病例约 290 万例, 死亡人数超 9.5 万, 疫情在公共卫生基础设施薄弱、卫生管理水平落后的国家和地区尤为严峻[1–2]。在我国对外经贸往来与人员跨境流动日趋频繁的背景下, 水体、水产品、食品等外环境被霍乱弧菌污染的隐患持续存在, 输入性疫情与本地暴发风险长期存在。

霍乱弧菌广泛分布于自然淡水与海水环境中, 可感染虾、蟹、贝类等各类水产动物, 是典型的食源性、水源性致病菌。该菌感染剂量极低, 健康人群摄入含 10^2~10^4 CFU 霍乱弧菌的污染食物, 或饮用含 10^8~10^{10} CFU 该菌的污染水源即可发生感染; 胃酸缺乏、胃肠功能紊乱等高危人群的感染阈值可降至 10^3 CFU, 感染风险显著升高[3–4]。此外, 孢子、果蝇等生物可通过机械携带方式传播病菌, 进一步拓宽传播途径[5]。感染者典型临床表现为急性水样腹泻、呕吐、脱水等症状, 重症患者可快速出现循环衰竭、代谢性酸中毒、休克, 甚至可在 48 h 内死亡。极低的食源性感染剂量与高危人群低暴露阈值, 对环境、水体及食品样本中微量活菌的精准检测、早期污染预警体系建设提出了严苛的技术要求。

基于菌体表面 O 抗原差异, 霍乱弧菌可分为 200 余个血清群[6], 依据产毒能力又可划分为产毒株与非产毒株, 其中仅 O1 群、O139 群产毒株是引发霍乱暴发与流行的主要致病菌。目前我国霍乱常规检测主要依据 WS 289-2008《霍乱诊断标准》, 采用传统微生物分离鉴定方法, 需经过增菌(6~8 h)、分离培养(18~24 h)、纯培养(18~24 h)、生化鉴定及血清学鉴定等多个步骤, 检测周期长、操作繁琐、灵敏度有限, 且易受样本基质与人为操作干扰, 引发漏检、误判, 难以满足甲类传染病“早发现、早隔离、早处置”的快速应急处置需求。

核酸检测技术的快速发展推动了霍乱弧菌检测体系的全面革新。与霍乱发病机制相关的核心基因主要有 *ompW*、*ctxAB* 和 *tcpA*。其中 *ompW* 为高度保守的特异性外膜蛋白编码基因, 种属特异性强、检测稳定性高, 可有效区分霍乱弧菌和其他近缘弧菌, 适用于各类样本的初筛与菌种确认; *ctxAB* 编码霍乱毒素, 是决定霍乱弧菌致病性的核心基因, 仅在产毒菌株中高表达, 多用于病例确诊和样本毒力检测[7]; *tcpA* 编码毒素共调节菌毛, 介导细菌肠道定植与生物膜形成, 与 *ctxAB* 协同受毒力系统调控, 可用于菌株生物型分型与疫情溯源分析。现行 WS 289—2008 行业标准制定年限较早, 虽明确了霍乱诊断依据与细菌培养、血清凝集、核酸检测等实验室方法, 但已难以适配当前检测技术迭代与多元化应用场景的需求。

现有综述多侧重霍乱核酸检测单项技术介绍, 缺乏系统性横向对比和场景化分析, 对活的但不可培养状态(viable but non culturable state, VBNC)、死菌 DNA 假阳性等行业共性难题的梳理与探讨较为零散。基于此, 本文系统梳理霍乱弧菌主流核酸检测技术的研究进展, 对比分析各类技术的性能优势、局限与适用场景, 总结当前检测领域的关键共性技术难题, 并结合实际防控需求提出技术选用与优化方案, 旨在为新时期霍乱疫情监测、应急处置与常态化防控提供理论依据与技术参考。

1　聚合酶链式反应技术

1.1　普通聚合酶链式反应技术

普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是通过针对霍乱弧菌特异性靶基因设计引物, 经变性、退火、延伸的循环反应实现目标 DNA 片段的体外高效扩增, 结合琼脂糖凝胶电泳即可完成病原检测。该技术以样本核酸为模板, 搭配引物、DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)等反应体系, 经 30~40 个循环扩增后, 依据特异性电泳条带的有无判定检测结果, 单样本整体检测时长为 3~4 h。基于 *ompW* 基因的引物体系可实现所有霍乱弧菌血清群的广谱特异性检测, 靶向 *ctxAB* 基因的扩增体系则可精准区分产毒株与非产毒株, 有效适配霍乱菌种鉴定与毒力初步筛查需求[8]。

相较于传统培养法, 普通 PCR 可检出微量菌体核酸, 能够识别低载量带菌个体与轻度污染水样, 检测灵敏度显

著提升, 同时可满足流行病菌株分型调查需求[9−10]。与等温扩增技术相比, 该技术引物设计简单、结果判读客观、试剂成本低廉, 在常规实验室中结合基因测序技术, 仍是霍乱弧菌分子溯源与分型研究的基础方法[11]。但普通 PCR 需开盖电泳, 气溶胶污染风险较高, 假阳性率可达 5%~10%, 且无法实现定量检测、整体灵敏度偏低[12−13]。目前该技术已逐步被新型 PCR 技术替代, 仅在资源匮乏地区与基层实验室用于初步筛查, 实际应用中需严格执行分区操作、使用无酶一次性耗材, 并搭配尿嘧啶 DNA 糖苷酶(uracil-DNA glycosylase, UNG)防污染体系, 最大限度降低检测误差[14]。

1.2 实时荧光定量聚合酶链式反应技术

实时荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, qPCR)是在普通 PCR 基础上引入荧光染料或 TaqMan 探针、分子信标等荧光标记体系, 通过实时监测扩增过程中的荧光信号变化, 实现目标核酸的精准定量检测, 信号强度与扩增产物含量呈正相关。目前霍乱弧菌 qPCR 检测常用靶标包括菌种通用基因、O1/O139 群特异性基因及毒力基因 *ctxAB*, 同时 *zot*、*ace*、*hlyA*、*rtxC* 等基因也可作为辅助检测标志物[15−22]。李丹丹等[23]建立的霍乱弧菌 qPCR 快速检测方法最低检出限(limit of detection, LOD)为 25 CFU/mL。马晨晨等[24]在对比使用 qPCR 和普通 PCR 检测霍乱弧菌时发现, 前者最低 LOD 为 10 copies/μL, 远远优于后者(1×10^5 copies/μL)。

该技术全程闭管扩增、无需后续开盖处理, 可将产物污染导致的假阳性风险控制在 1%以下[24]。检测时长仅 1~2 h, 具备重复性好、准确性高、检测快速的优势, 可适配粪便、水体、水产品等多类样本检测, 广泛用于临床菌株载量评估、感染程度判定与治疗效果监测。与数字 PCR 相比, qPCR 检测通量更高、成本更低、检测速度更快; 与等温扩增技术相比, 结果重复性与定量精准度更具优势[25]。但 qPCR 技术依托生物安全二级实验室, 存在引物探针设计门槛高、扩增产物片段较短的缺陷, 且依赖大型荧光定量 PCR 仪器, 进口设备单价高达 15~30 万元, 单样本检测试剂成本为 80~110 元, 配套质控成本也相对较高, 加之基层人员难以自主优化引物探针体系, 极大限制了其在基层现场与非实验室场景的推广应用。未来可通过推广国产便携式 qPCR 设备、研发预制冻干反应试剂盒等方式, 降低设备与技术门槛, 拓展基层应用场景[26]。

1.3 多重聚合酶链式反应技术

多重 PCR 技术的核心原理为在单一反应体系中加入多组特异性引物, 可同步扩增多个目标 DNA 片段, 实现单一反应多靶标联合检测。周茜等[27]、蒋蔚等[28]、杨亚琨等[29]相继成功地建立了针对霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌等不同弧菌或其他食源性致病菌的多重 PCR 检测方法, 能够满足鉴定出两种及以上病原体的实际检测需求, 其检测霍乱弧菌的灵敏度最低可达 10^2 CFU/mL。霍乱多重 PCR 的核心价值在于同时覆盖种属特异性(*ompW*/*toxR*)、血清型(*rfbO1*/*rfbO139*)、毒力(*ctxA*/*tcpA*), 1 次反应完成“是否霍乱→哪群/型→是否产毒”的全链条判定[30], 通过 *ctxA*、*tcpA*、*rfb* 等基因交叉验证, 可避免单一靶标检测造成误判, 有效排除其他弧菌及杂菌干扰, 特异性可达 98%~100%, 适合暴发期快速分型、流行病学调查与大规模监测[31]。跟分离培养法、普通 PCR、单一 PCR 相比, 多重 PCR 检测时长仅为 2~3 h; 单管替代多管, 可节约 50%以上的样本、试剂与人力成本, 时效性与经济性优势显著[32−33]。但该技术体系优化难度较大, 体系内多组引物易形成引物二聚体并产生非特异性扩增; 不同靶基因 GC 含量、解链温度差异较大, 反应参数需折中设置, 易造成部分靶标扩增效率不均, 甚至导致低丰度靶标漏检; 同时引物设计需依托专业生物信息学软件, 研发周期长、成本高, 对实验条件与操作人员专业度要求严苛, 一定程度限制了其规模化应用。

1.4 数字聚合酶链式反应

数字 PCR (digital PCR, dPCR)是最新一代 PCR 技术, 通过将反应体系分割成几十到几万份独立反应单元, 使每个单元包含一个或多个拷贝的核酸模板, 经独立扩增后统计阳性单元荧光信号, 无需依赖扩增曲线与循环阈值(cycle threshold, Ct)值, 不受阳性对照、标准曲线和扩增效率的影响, 可直接统计核酸分子拷贝数, 实现对起始样本核酸分子的绝对定量分析, 定量变异系数(coefficient of variation, CV)<5%[34−35]。其中微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)是目前研究和应用最为广泛的 dPCR。聂丹丹等[36]利用 ddPCR 法检测霍乱弧菌的最低 LOD 可达 2.9 copies/μL, 灵敏度比 qPCR 高 10~100 倍, 可精准区分患者急性期、恢复期与带菌状态。另外, ddPCR 的微滴分割模式可有效隔离单孔污染影响, 大幅降低交叉污染概率[37], 同时对粪便胆盐、海水腐殖酸等抑制剂的耐受能力较 qPCR 提升 3~5 倍, 粗提样本即可完成检测, 无需严格核酸纯化, 适合消毒后水体、贝类、服药后粪便等死菌 DNA 干扰严重、活菌载量低的疑难样本检测[38]。但 ddPCR 存在明显应用短板, 实验流程包括微滴生成、扩增、荧光读取、数据分析, 全程耗时 4~5 h, 操作精细度要求高、技术门槛高; 多引物探针体系易出现非特异性结合, 体系优化周期长; 专用的微滴式/芯片式 dPCR 仪单价为普通 qPCR 仪的 3~5 倍, 探针、微滴生成油等单次检测耗材成本超 200 元, 设备及运维成本高, 难以在基层实验室普及, 不适配大规模现场筛查需求, 仅适用于实验室精准定量、低载量样本检测与菌株溯源研究[39]。综上, 总结对比出各 PCR 技术的综合性能和主要应用场景, 见表 1。

表 1　霍乱弧菌 PCR 检测技术综合性能对比表

Table 1　Comprehensive performance comparison table of PCR detection technology for *Vibrio cholerae*

技术类型	普通 PCR	qPCR	多重 PCR	dPCR
LOD/(copies/μL)	1×10^5	1×10^1	10^2	2.9
单样本检测耗时/h	3~4	1~2	2~3	3~4
核心设备	普通 PCR 仪	qPCR 仪	qPCR 仪	微滴数字 PCR 仪
抗复杂基质能力	弱	中等	弱	强
防污染设计	无	闭管检测	无	微滴分割+闭管
活细胞检测能力	否	需结合 PMA	否	需结合 PMA
主要应用场景	实验室初筛、分型	临床确诊、定量检测	多病原体同时筛查	低载量样本、溯源研究

注: 单氮化丙啶(propidium monoazide, PMA)。

2　等温扩增技术

2.1　环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是基于 DNA 链置换反应的恒温扩增技术, 依托嗜热脂肪地芽孢杆菌 DNA 聚合酶在 60~65 ℃恒温条件下, 通过 4~6 条特异性引物识别靶基因 6~8 个保守区域, 可在 1 h 内完成目标片段高效扩增, 扩增产物主要为串联重复茎环结构, 可通过肉眼显色、荧光信号、浊度变化或琼脂糖电泳判定结果[40–44]。目前针对霍乱弧菌 *ace*、*zot*、*cri*、*nanH*、*ctxA* 等基因构建的 LAMP 检测体系, 最低 LOD 可达每反应 1.85 pg 基因组 DNA 或每反应 2.5 CFU 的细胞, 检测灵敏度约为普通 PCR 的 10 倍[45–46], 对环境水样低丰度菌株及 VBNC 状态霍乱弧菌具备良好的筛查能力[47]。

该技术无需精密热循环仪器、操作简便、结果可视化, 适合基层批量初筛, 但实际应用中存在显著短板: 多引物体系易受样本基质与低拷贝模板影响, 引发引物二聚体、非模板扩增及气溶胶污染, 假阳性风险较高[48]; 扩增产物结构复杂, 无法直接用于测序溯源, 阳性结果需结合培养、qPCR 或全基因组测序进一步验证。同时免提取检测模式虽简化操作, 但易受水产品、污水、粪便中腐殖酸、盐分、蛋白等抑制剂干扰, 稳定性不足。实际应用中需采用多靶标分层检测策略, 搭配空白对照、阳性对照与内参对照, 优先选用闭管荧光检测体系, 构建脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate, dUTP)与尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UDG)配合使用的防污染系统, 保障检测准确性[45–48]。

2.2　重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)借助重组酶、单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)和链置换 DNA 聚合酶, 在 37~42 ℃左右的恒温状态下完成引物入侵、链置换和延伸, 通常 20 min 内即可获得扩增信号[49–51]。该技术对设备要求低, 可与侧向流试纸条(lateral flow strip, LFS)或荧光探针结合, 形成扩增和判读一体化的现场检测模式。蒋丽婷等[52]建立的霍乱弧菌 RPA 检测方法以 *ompW* 为靶基因, 可扩增出 280 bp 特异性条带, 灵敏度与 qPCR 相当, 均达到 0.1 ng/μL。王培等[53]将 RPA 与三段式 LFS 结合, 建立霍乱弧菌与创伤弧菌双重现场检测体系, 其中霍乱弧菌以 *lolB* 为检测标记, 在 37 ℃反应 30 min 后通过试纸条 5 min 判读, 该方法检测灵敏度为每反应 10 拷贝核酸, 在食品样本中可检出每 10 g 加标样品内 1 CFU 活菌。

相较于 LAMP 技术, RPA 反应温度更低、引物设计相对简便、产物片段较单一, 便于后续测序复核验证, 适配现场快速筛查。但该技术存在明显应用局限, 核心酶和探针体系依赖商品化试剂, 冷链运输、有效期与批间差异会影响基层常态化检测稳定性; 对引物二聚体与探针背景噪声敏感, 弱阳性样本若无内对照与重复验证, 易出现误判。尤其 RPA-LFS 开盖判读模式易产生气溶胶污染, 单次污染可持续影响多批次检测结果。实际应用中应优先选用闭管荧光 RPA 体系与一次性密闭装置, 严格单向流程和分区操作, 配套滤芯耗材与 dUTP/UDG 防污染体系, 弱阳性样本需通过 qPCR 复核确认, 规避检测误差[53–54]。

2.3　重组酶介导的等温扩增技术

重组酶介导的等温扩增技术(recombinase-aided isothermal amplification, RAA)的基本过程是在 37~42 ℃恒温条件下, 重组酶先与引物结合形成复合物并侵入双链 DNA, 随后在 DNA 聚合酶作用下启动链置换延伸, 15~30 min 即可产生目标片段, 适配简易恒温设备, 基层落地性更强。郭晨瑶等[55]以 *ompW* 基因为靶标构建荧光 RAA 体系, 纯菌 LOD 为 6.7×10^2 CFU/mL, 经 12 h 增菌后 LOD 可降至 6.7×10^{-2} CFU/mL。陈家良等[56]基于霍乱弧菌接合性转座子建立的 RAA 联合侧向流动分析(lateral flow dipsticks, LFD)方法, 最低可检出 20 拷贝/μL 核酸, 同时兼顾病原筛查与耐药风险识别需求。李达容[57]通过模拟养殖水体、水产样本检测显示, RAA-LFD 可有效检出低浓度霍乱弧菌(7.4 CFU/g), 灵敏度(2.5 fg/μL)较常规 PCR 法(25 fg/μL)高出 10 倍, 且受到食品基质的影响较小。

与 qPCR 相比, RAA 检测设备适配性广, 金属浴、水浴锅、便携式恒温模块均可满足反应需求, 在腹泻病例排查、口岸抽检、农贸市场应急筛查、养殖水域风险监测中, RAA 可先完成快速分流, 实现检测关口前移。阴性样本结合流行病学风险决定是否富集复检, 阳性样本则立即启动复核、留样、培养分离和溯源, 更贴近基层疾控和市场监管的真实工作条件。

多重 RAA 在其他食源性病原检测中的应用也说明, 该技术具有向多靶标联检扩展的空间[58]。因此可采用分层靶标设计, 通过 *ompW*、*ctxA*/*B*、*rfbO1*/*O139* 的组合检测, 同步完成菌种鉴定、产毒判定、血清分型与耐药风险提示, 避免单一靶标误判。该技术现存瓶颈主要为商品化试剂依赖冷链储运、批间稳定性有待提升, 开盖 LFD 判读模式存在气溶胶污染风险, 且该技术在不同类型样本中的检测阈值差异明显。后续需通过冻干试剂研发、密闭卡匣改造、本地化基质验证与标准化质控流程优化, 提升技术稳定性与可靠性[55–58]。

2.4 多酶恒温核酸快速扩增技术

多酶恒温核酸快速扩增技术(multi-enzyme isothermal rapid amplification, MIRA)的基本机制是在 25~42 ℃的宽温域恒温条件下, 重组酶与特异性引物先形成复合体, 并在辅助蛋白和单链 DNA 结合蛋白的帮助下侵入双链 DNA 模板; 随后 DNA 聚合酶在引物 3′端启动延伸, 约 20 min 内完成扩增。按判读方式不同, MIRA 可分为基础 MIRA、实时 MIRA 和 MIRA-LFD, 分别对应凝胶电泳、实时荧光采集和侧流试纸条 3 种检测模式。李盛杰等[59–60]针对霍乱弧菌 *ompW* 保守序列设计引物组, 并利用 MIRA 法结合胶体金试纸条进行检测, 筛选得到的引物探针组合具有较好特异性, 灵敏度可低至 10 fg/μL。丁卫平等[61]围绕霍乱弧菌 O1 群、O139 群及产毒相关编码基因设计引物与探针, 建立的 MIRA 方法可同时适配 O1 群与 O139 群产毒株鉴定需求, 检测灵敏度为 70 fg/μL 或 290 fg/μL。

MIRA 的反应温度低、扩增速度快, 设备依赖度低, 便携适配性优异, 适合野外现场与低资源场景筛查。其局限性主要在于该技术体系尚未成熟, 方法学验证与应用数据积累少于其他等温扩增技术, 且凝胶电泳、开放式试纸条判读模式存在开盖操作, 气溶胶污染风险突出。应优先选用闭管荧光检测与密闭式 LFS 体系, 严格落实分区操作、一次性耗材使用、扩增后不开盖等防污染策略, 搭配多靶标联合检测与平行复核机制, 规避单一检测的结果偏差, 提升检测准确性[61]。

综合来看, 各类等温扩增技术各有优劣, 单一的方法都不宜承担霍乱暴发确证和分子溯源任务, 需结合场景组合应用、交叉复核[62–63]。各等温扩增技术的的综合性能比较和主要应用场景, 见表 2。

3 霍乱弧菌核酸检测技术的关键共性问题与应用

3.1 霍乱弧菌核酸检测的关键共性问题

当前各类核酸检测技术在灵敏度、时效性上已全面优于传统培养法, 能够快速识别霍乱弧菌感染与污染风险, 但在复杂现场场景应用中, 假阳性、假阴性问题仍普遍存在, 是制约检测精准度、影响结果可靠性的核心瓶颈, 也是现阶段技术优化的重点方向。

3.1.1 死菌残留和 VBNC 状态检测难题

核酸检测无法区分核酸来源为活菌、死菌或 VBNC 状态菌株, 是导致结果误判、风险高估的主要原因。临床场景中, 患者经有效抗生素治疗后, 活菌排菌周期可缩短至 5 d 以内, 但粪便样本中死菌残留 DNA 仍可在治疗后 7~28 d 持续检出, 易将康复期患者误判为现症感染者, 造成不必要的隔离管控与医疗资源浪费[64–68]。环境场景中, 自然水体死菌 DNA 可稳定存留 14~30 d, 疫情后环境消杀监测中, 残留核酸干扰易导致假阳性结果, 无法真实反映水体活菌污染水平, 误导疫情风险评估[69]。此外, 霍乱弧菌在低温、营养匮乏、高盐、抗生素胁迫等环境压力下可进入 VBNC 状态, 该状态菌株无法在常规培养基生长, 核酸扩增响应弱, 但可在适宜条件下复苏致病, 是霍乱间歇期隐蔽传染源[70]。流行区外环境水体中 VBNC 状态霍乱弧菌占比可达 30%~60%, 常规核酸检测无法区分 VBNC 菌株、死菌与活菌, 易造成活菌载量高估与疫情风险误判[71–72]。

表 2 霍乱弧菌等温扩增检测技术综合性能对比表

Table 2 Comprehensive performance comparison table of isothermal amplification detection technologies for *Vibrio cholerae*

技术名称	LAMP	RPA	RAA	MIRA
反应温度/℃	60~65	37~42	37~42	25~42
反应时间/min	30~60	15~30	15~30	10~30
核心优势	无需热循环仪; 特异性较强; 结果可视化	反应速度快; 温度要求低; 产物较单一	设备要求低; 适合现场筛查; 可结合荧光或 LFD	反应温度低; 扩增快; 便携性较好
主要局限性	引物设计复杂; 产物结构复杂; 非特异扩增和污染风险	试剂成本较高; 对酶活性敏感; 引物二聚体影响判读	开盖判读有污染风险; 反应效率受体系影响	公开验证研究有限; 开盖检测易污染
质控对策	设置内对照; 熔解曲线或探针确证; 闭管检测	优化引物探针; 实时荧光或封闭式检测; 阳性复核	冻干化试剂; 标准化操作; 设置基质加标对照	优先闭管荧光; 密封式 LFD; 多方法复核
主要应用场景	基层现场初筛	现场快速检测	基层现场、大规模筛查	现场快速检测

普通核酸检测技术无法区分 VBNC 状态细菌和死菌残留, 会高估活菌数量。目前主要的解决方案有 3 种。(1)通过额外增加 PMA 预处理样本, PMA 穿透死菌破损细胞膜并结合其 DNA, 抑制死菌核酸扩增, 仅检出活菌信号, 可将死菌 DNA 假阳性率降至接近 0%。福建省疾病预防控制中心将三重 dPCR 与 PMA 预处理相结合, 用于霍乱弧菌活菌定量检测[38]。但该技术无法区分细胞膜完整的死菌与活菌, 对高浓度残留 DNA 抑制效果有限, 且试剂本身会轻微抑制 PCR 扩增, 后续可通过研发新型活细胞甄别染料, 如溴化乙锭单叠氮化物(ethidium monoazide, EMA)、碘化丙啶单叠氮化物改进型(propidium monoazide xx, PMAxx); 优化 PMA 处理条件, 如光照时间、PMA 浓度; 甚至可以考虑将 PMA 与噬菌体扩增法结合来提升甄别效能[73–74]。(2) DNA 和 mRNA 双重靶标扩增验证, 通过核酸类型的差异判定菌株活性。DNA 与 mRNA 双阳性判定为活菌污染、存在致病风险; 仅 DNA 阳性则判定为死菌残留、无现行传播风险[75]。(3)将核酸检测技术与噬菌体相结合, 利用噬菌体特异性侵染活霍乱弧菌并增殖裂解菌体的特性, 通过分析噬菌体加入样本扩增前后的 Ct 差值来判断霍乱弧菌活菌存在与否。陈曦等[76]基于 VP1 噬菌体的特异性基因 gp46 建立的 TaqMan-qPCR 方法扩增效率接近 93%, 灵敏度比基于毒力基因 *ctxB* 建立的 TaqMan-qPCR 方法提高了 100 倍。但该技术操作流程复杂、检测时长可达 6~8 h, 涉及到特异性霍乱弧菌噬菌体的培养和低温长期保存, 需稳定宿主菌、半固体琼脂、孵育过夜、效价滴定, 单样本检测时间、成本和难度均显著高于单纯 qPCR, 且现阶段无成熟商品化试剂盒支撑, 难以满足肠道门诊即时排查、口岸快速放行、突发疫情紧急处置的监测要求[77]。

3.1.2　复杂样本基质的干扰问题

霍乱弧菌检测的常见样本包括临床粪便、养殖水体、自然海水、污水、水产食品等, 这类样本中富含腐殖酸、多糖、蛋白质、重金属离子、胆盐等抑制物, 可显著抑制 DNA 聚合酶的活性, 导致扩增效率下降、检测灵敏度下降 60%~85%, 甚至出现假阴性结果[78–79]。相关研究表明, 未经前处理的海水样本, 其高盐、有机质成分可对 Taq 酶产生 90%~100%的抑制, 完全阻断核酸扩增反应, 严重影响外环境样本检测准确性[80–81]。

目前应对基质干扰的主流方案为优化样本前处理与扩增体系, 通过磁珠法、硅胶柱法等高效核酸提取技术去除杂质抑制物, 同时在扩增体系中添加牛血清白蛋白、二甲基亚砜、甘油等抗干扰试剂, 提升体系耐受性, 有效改善复杂样本的扩增效果, 保障检测稳定性与准确性。

3.2　霍乱核酸检测技术的应用

霍乱弧菌核酸检测的核心矛盾是实验室要精准定量、溯源质控, 现场要快、便携、低成本、抗抑制。因此必须紧扣公共卫生疫情防控、水产品与水环境食品安全检测双重实际需求, 结合各类核酸检测技术的性能差异与适用特点, 构建多种等温扩增与 PCR 联用, 整合互补的分层检测模式, 覆盖不同场景与资源条件, 实现从基层初筛、批量排查到实验室精准确证的全链条、标准化检测体系, 详细推荐方案见表 3。

表 3　霍乱核酸检测在不同场景下的应用推荐方案
Table 3　Recommended schemes of nucleic acid detection for *Vibrio cholerae* in different application scenarios

应用场景	主推技术	核心优势	核心用途
现场应急	RAA/RPA 初筛	抗干扰、免提取体系、快速出结果、便携易操作	疫情卡点、口岸、门诊快速排查
大批量筛查	优化型 LAMP 技术+ qPCR 抽检复核	通量高、性价比优、稳定筛查体系	环境、食品、人群批量排查, 快速锁定高污染点位和高危人群
实验室确证	qPCR+PMA-ddPCR	精准溯源、绝对定量、结果权威	临床确诊、低载量样本检测、活细胞定量
边远基层	封闭式 MIRA/简易 LAMP	免提取一体化前处理、闭管防污染初筛体系	人群、水源、水产品全域常态化风险初步筛查

4　展　望

立足现有研究基础, 未来霍乱弧菌核酸检测技术将以便携化、智能化、经济化为核心迭代方向, 推动高端检测技术下沉基层、适配多场景普惠应用。在现有技术体系优化层面, 可推进等温扩增与微流控技术深度融合, 依托芯片集成、全封闭检测、低成本量产等优势, 解决传统方法气溶胶污染、复杂样本检出率低等问题, 实现霍乱弧菌鉴定及毒力分型的现场高通量检测[82–85]; 同时推广免离心、无有机溶剂的核酸提取检测一体化便携设备, 摒弃人工模板转移操作, 简化检测流程、压缩检测时长, 该类设备无需大型配套设施、支持单人全流程操作, 可适配基层疾控筛查、野外水环境监测及突发疫情应急检测等多元场景[86–94]; 此外可多维度优化国产 RPA/RAA 试剂的酶活稳定性、复杂基质耐受性及常温储运性能, 完善配套质控体系, 打破进口试剂垄断, 有效降低检测成本。

在前沿技术融合创新层面, 依托大数据技术构建霍乱专项检测数据库, 耦合地理、气象、水文等多维外部数据, 实现菌株溯源、流行态势追踪与疫情风险智能预警[95–96]; 借助人工智能算法实现检测信号自动判读与引物探针智能设

计，可实时识别加样错误、扩增异常、设备故障、实验污染等问题并发出预警，强化实验室质控能力，并结合测序数据实现毒力基因自动分型与毒力等级精准判定[97–99]；借助纳米材料与纳米传感技术实现核酸高效富集与检测信号放大，支撑免提取直接扩增检测模式[100]，显著提升低丰度样本检出灵敏度，增强等温扩增试剂在野外及基层复杂环境中的适配稳定性。

综上，通过传统技术优化与前沿技术融合的双向创新，可有效突破当前霍乱核酸检测的技术局限，构建精准、快速、低成本的一体化检测体系，为我国霍乱常态化监测、突发疫情应急处置及公共卫生应急防控体系建设提供坚实技术支撑。

参考文献

[1] Ali M, Nelson A R, Lopez A L, et al. Updated global burden of cholera in endemic countries [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015, 9(6): e0003832.

[2] Ali M R, Bacchu M S, Setu M A A, et al. Development of an advanced DNA biosensor for pathogenic *Vibrio cholerae* detection in real sample [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 188: 113338.

[3] Wang H Q, Yang C, Sun Z, et al. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxigenic lineages [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(2): e0008046.

[4] Chowdhury F, Ross A G, Islam M T, et al. Diagnosis, management, and future control of cholera [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2022, 35(3): e0021121.

[5] Richterman A, Sainvilien D R, Eberly L, et al. Individual and household risk factors for symptomatic cholera infection: a systematic review and meta-analysis [J]. Journal of Infectious Diseases, 2018, 218: S154–S164.

[6] Deen J, Mengel M A, Clemens J D. Epidemiology of cholera [J]. Vaccine, 2020, 38(Suppl 1): A31–A40.

[7] Kaper J B, Morris J G J, Levine M M. Cholera [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1995, 8(1): 48–86.

[8] 刘纯宏, 易雪丽, 陆玉兰, 等. 广西百色地区 1 例乙肝肝硬化患者血液非 O1/非 O139 群霍乱弧菌感染的鉴定[J]. 右江医学, 2024, 52(10): 918–925.
Liu Chunhong, Yi Xueli, Lu Yulan, et al. Identification of non O1/non O139 *Vibrio cholerae* infection in the blood of the first patient with hepatitis B cirrhosis in Baise, Guangxi [J]. Youjiang Medical Journal, 2024, 52(10): 918–925.

[9] 胡建蓉, 李诚林, 杜长远. PCR 与平板培养在食物中毒检测中的应用对比[J]. 食品安全导刊, 2025(11): 91–94.
Hu Jianrong, Li Chenglin, Du Changyuan. Comparison of the application of PCR and plate culture in food poisoning detection [J]. Journal of Food Safety Guide, 2025(11): 91–94.

[10] Dick M H, Guillerm M, Moussy F, et al. Review of two decades of cholera diagnostics: how far have we really come? [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2012, 6(10): e1845.

[11] 李娟, 张艳, 陈晨. PCR 测序技术在霍乱弧菌分型及疫情溯源中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(8): 945–948.
Li Juan, Zhang Yan, Chen Chen. Application value of PCR sequencing technology in *Vibrio* cholerae typing and epidemic source tracing [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(8): 945–948.

[12] 周海健, 阚飙. 霍乱弧菌分子分型技术研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(5): 613–618.
Zhou Haijian, Kan Biao. Research progress on molecular typing techniques of *Vibrio* cholerae [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2019, 40(5): 613–618.

[13] Hassard F, Smith C, Barker G, et al. Comparison of conventional PCR, real-time PCR and digital PCR for detection of *Vibrio cholerae* in environmental waters [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 175: 105894.

[14] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611–622.

[15] 张晟, 王梓琪, 马志锋, 等. 深圳市 2024 年 1 起境外输入霍乱疫情的流行病学调查[J]. 中国热带医学, 2025, 25(2): 253–258.
Zhang Sheng, Wang Ziqi, Ma Zhifeng, et al. Epidemiological investigation of one imported cholera epidemic in Shenzhen in 2024 [J]. China Tropical Medicine, 2025, 25(2): 253–258.

[16] 王伟杰, 刘海霞, 岳航羽, 等. 7 株水产品来源的霍乱弧菌的全基因组特征分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(19): 314–320.
Wang Weijie, Liu Haixia, Yue Hangyu, et al. Genome-wide characterization of 7 strains of *Vibrio cholerae* isolated from aquatic products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(19): 314–320.

[17] 陈吉铭, 张琴超, 陈金堃, 等. 2020—2021 年绍兴市水产品和腹泻患者来源的霍乱弧菌耐药性与分子特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(4): 504–509.
Chen Jiming, Zhang Qinchao, Chen Jinkun, et al. Antibiotic resistance and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* from aquatic products and diarrhea patients in Shaoxing from 2020 to 2021 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(4): 504–509.

[18] 高源, 王卫华. 一株 O139 群霍乱弧菌产毒株基因组特征及耐药性[J]. 现代疾病预防控制, 2025, 36(3): 223–229.
Gao Yuan, Wang Weihua. Genomic characterization and drug resistance of a toxin-producing strain of *Vibrio cholerae* O139 [J]. Modern Disease Control and Prevention, 2025, 36(3): 223–229.

[19] 吴小凤, 陈洁, 许雅辉, 等. 一起由非产毒型霍乱弧菌引起的感染性腹泻的实验室检测及分子分型[J]. 海峡预防医学杂志, 2024, 30(1): 48–50.
Wu Xiaofeng, Chen Jie, Xu Yahui, et al. Laboratory detection and molecular typing of an infectious diarrhea caused by non-toxic *Vibrio cholerae* [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2024, 30(1): 48–50.

[20] 仇绮琳, 郑悦康, 区金结, 等. 广东省中山市非 O1/非 O139 群霍乱弧菌分子特征及耐药性[J]. 中国热带医学, 2023, 23(6): 619–624.
Qiu Qilin, Zheng Yuekang, Ou Jinjie, et al. Molecular characteristics and drug resistance of non-O1/non-O139 *Vibrio* cholerae in Zhongshan City, Guangdong Province [J]. China Tropical Medicine, 2023, 23(6): 619–624.

[21] 张萍, 邹林, 高翔, 等. 2022 年北京市通州区一起霍乱疫情分离菌株的病原学特征分析[J]. 疾病监测, 2023, 38(12): 1553–1559.
Zhang Ping, Zou Lin, Gao Xiang, et al. Etiological characteristics of a cholera epidemic in Tongzhou district, Beijing, 2022 [J]. Disease Surveillance, 2023, 38(12): 1553–1559.

[22] 赵剑虹, 顾琳, 高艳, 等. 2012—2019 年北京市朝阳区霍乱弧菌毒力基因和 PFGE 分子分型特征分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(12): 903–908.
Zhao Jianhong, Gu Lin, Gao Yan, et al. Serotypes, virulence genes and PFGE profiles of *Vibrio cholerae* strains isolated in Chaoyang district of Beijing, 2012—2019 [J]. China Preventive Medicine, 2021, 22(12): 903–908.

[23] 李丹丹, 徐义刚, 邱索平, 等. 霍乱弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2016(11): 106–108.
Li Dandan, Xu Yigang, Qiu Suoping, et al. Establishment of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for rapid detection of *Vibrio cholerae* [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine (Second Half of the month), 2016(11): 106–108.

[24] 马晨晨, 宋昌彦, 马梦杰, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测 4 种食源性致病弧菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(21): 22–31.
Ma Chenchen, Song Changyan, Ma Mengjie, et al. Rapid determination of 4 kinds of foodborne pathogenic species of *Vibrio* by quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(21): 22–31.

[25] 黄福斌, 舒而怡, 范宏亮. 新型等温扩增技术在水源性致病菌检测中的应用研究进展[J]. 环境与职业医学, 2025, 42(4): 503–511.
Huang Fubin, Shu Eryi, Fan Hongliang. Research progress on application of novel isothermal amplification technology in waterborne pathogens detection [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2025, 42(4): 503–511.

[26] 中国疾控中心. 2025 年基层病原分子检测能力建设评估报告[R]. 北京: 中国疾控中心, 2025.
Chinese Center for Disease Control and Prevention. 2025 Assessment Report on Pathogen Molecular Testing Capacity Building at the Primary Level [R]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2025.

[27] 周茜, 方林芳, 李凤霞, 等. 水产品中副溶血弧菌、溶藻弧菌和霍乱弧菌三重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(4): 262–270.
Zhou Qian, Fang Linfang, Li Fengxia, et al. Development of triple PCR method for detecting *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic foods [J]. China Food Additives, 2024, 35(4): 262–270.

[28] 蒋蔚, 易力, 陈永军, 等. 水产品中霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(1): 44–51.
Jiang Wei, Yi Li, Chen Yongjun, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of vibrioparahaemolyticus, vibriocholerae and vibriovulnificus in aquatic foods [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2016, 24(1): 44–51.

[29] 杨亚琨, 刘永杰, 董雨豪. 多重聚合酶链式反应技术检测罗非鱼 5 种常见食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 168–174.
Yang Yakun, Liu Yongjie, Dong Yuhao. Determination of 5 kinds of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus* by multiplex polymerase chain reaction technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(2): 168–174.

[30] 李柏生, 谭海玲, 邓小玲, 等. 多重 PCR 同步检测霍乱弧菌种属、血清型及毒力基因的方法建立与应用[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(7): 1289–1294.
Li Baisheng, Tan Hailing, Deng Xiaoling, et al. Establishment and application of a multiplex PCR method for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, serotypes and virulence genes [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2021, 42(7): 1289–1294.

[31] Yan Yong, Zhan Li, Zhu Guoying, et al. Direct and rapid identification of *Vibrio cholerae* serogroup and toxigenicity by a novel multiplex real-time assay [J]. Pathogens, 2022, 11(8): 865.

[32] 郑伟, 杨蜀罡, 林鑫, 等. 多重 PCR 技术在急诊肺部感染患者病原学诊断中的应用价值[J]. 四川医学, 2025, 46(4): 391–396.
Zheng Wei, Yang Shugang, Lin Xin, et al. Application value of multiple PCR in etiological diagnosis of emergency pulmonary infection patients [J]. Sichuan Medical Journal, 2025, 46(4): 391–396.

[33] 王静, 刘军, 张芳. 多重 PCR 技术在食源性致病菌检测中的应用及局限性[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(3): 456–461.
Wang Jing, Liu Jun, Zhang Fang. Application and limitations of multiplex PCR technology in the detection of foodborne pathogens [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(3): 456–461.

[34] Salipante S J, Jerome K R. Digital PCR: principles and applications [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2020, 33(4): e00022–20.

[35] 王静, 刘军, 张芳. 数字 PCR 技术在病原体检测中的应用进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(2): 245–251.
Wang Jing, Liu Jun, Zhang Fang. Progress in the application of digital PCR technology in pathogen detection [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(2): 245–251.

[36] 聂丹丹, 丁旭, 姜佳颖, 等. 利用微滴数字 PCR 仪定量检测贝类中两种弧菌方法的建立[J]. 现代科学仪器, 2024, 41(1): 48–53.
Nie Dandan, Ding Xu, Jiang Jiaying, et al. Establishment of a quantitative detection methodfor tow types of *Vibrio* in shellfish by droplet digital PCR [J]. Modern Scientific Instruments, 2024, 41(1): 48–53.

[37] 魏咏新, 马丹, 李丹, 等. 食品中 *Escherichia coli* O157: H7 微滴数字 PCR 绝对定量检测方法的建立[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 259–265.
Wei Yongxin, Ma Dan, Li Dan, et al. Establishment of droplet digital PCR system for absolute quantitative detection of *Escherichia coli* O157: H7 in foods [J]. Food Science, 2020, 41(16): 259–265.

[38] Yang Jinsong, Xu Haibin, Ke Zili, et al. Absolute quantification of viable *Vibrio cholerae* in seawater samples using multiplex droplet digital PCR combined with propidium monoazide [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1149981.

[39] 李柏生, 邓小玲, 谭海玲, 等. 数字 PCR 在霍乱弧菌检测中的应用与展望[J]. 中华预防医学杂志, 2024, 58(5): 701–706.
Li Baisheng, Deng Xiaoling, Tan Hailing, et al. Application and prospect of digital PCR in the detection of *Vibrio cholerae* [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2024, 58(5): 701–706.

[40] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.

[41] Yang Nan, Zhang Han, Han Xiu, et al. Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1406632.

[42] 张朋朋, 黄月茹, 牛佳, 等. 基于环介导等温扩增技术建立非洲猪瘟病毒的快速高灵敏度检测方法[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2024(3): 399–404.

Zhang Pengpeng, Huang Yueru, Niu Jia, et al. Rapid high-sensitivity detection of African swine fever virus based on loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2024(3): 399–404.

[43] 张明亮, 王尧, 马圣明, 等. 一种犬细小病毒可视化LAMP检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2025(5): 51–58.
Zhang Mingliang, Wang Yao, Ma Shengming, et al. Establishment of a visual LAMP detection method for *Canine parvovirus* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2025(5): 51–58.

[44] 朱百佳, 刘晓宇, 李昕建, 等. 基于环介导等温扩增技术检测烟草疫霉菌[J]. 生物灾害科学, 2025, 48(1): 82–91.
Zhu Baijia, Liu Xiaoyu, Li Xinjian, et al. Detection of *Phytophthora nicotianae* based on a LAMP technique [J]. Biological Disaster Science, 2025, 48(1): 82–91.

[45] Chen Dailing, Liang Zhili, Ren Shunlin, et al. Rapid and visualized detection of virulence-related genes of *Vibrio cholerae* in water and aquatic products by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(1): 44–53.

[46] Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using loop-mediated isothermal amplification [M]. Holst O. Microbial toxins: Methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2011: 13–22.

[47] Chamanrokh P, Colwell R R, Huq A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2022, 68(2): 103–110.

[48] Kim S H, Lee S Y, Kim U, et al. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: a review [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1280: 341693.

[49] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.

[50] 潘莹, 杨家辉, 彭发永, 等. 重组酶聚合酶扩增技术结合侧流层析试纸条快速检测新加坡石斑鱼虹彩病毒[J]. 水产学报, 2024, 48(5): 105–115.
Pan Ying, Yang Jiahui, Peng Fayong, et al. Rapid detection of Singapore grouper iridovirus by a recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick [J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(5): 105–115.

[51] 侯玉婷, 俞梦楚, 王妍柏, 等. 重组酶聚合酶扩增技术用于脑脊液中肺炎链球菌检测的价值[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(16): 2316–2319.
Hou Yuting, Yu Mengchu, Wang Yanbai, et al. A study on detection of *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid by recombinase polymerase amplification assay [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(16): 2316–2319.

[52] 蒋丽婷, 孙浩洋, 赵培静, 等. 重组酶聚合酶扩增技术检测霍乱弧菌[J]. 质量安全与检验检测, 2020, 30(5): 5–8.
Jiang Liting, Sun Haoyang, Zhao Peijing, et al. Detection of *Vibrio cholerae* by rpa [J]. Quality Safety Inspection and Testing, 2020, 30(5): 5–8.

[53] Wang Pei, Liao Lei, Ma Chao, et al. Duplex on-site detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* by recombinase polymerase amplification and three-segment lateral flow strips [J]. Biosensors, 2021, 11(5): 151.

[54] Wang Lei, Zhao Panpan, Si Xinxin, et al. Rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* with an isothermal amplification and lateral flow strip combined method that eliminates false-positive signals from primer-dimers [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2959.

[55] 郭晨瑶, 梁莹, 胡同静, 等. 霍乱弧菌荧光 RAA 快速检测方法的建立和应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(23): 68–72.
Guo Chenyao, Liang Ying, Hutong Jing, et al. Establishment and application of rapid detection method of *Vibrio cholerae* by fluorescent RAA [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(23): 68–72.

[56] 陈家良, 卢盼, 王鲁彦, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术快速检测霍乱弧菌中 SXT 元件[J]. 中国预防医学杂志, 2022, 23(9): 705–708.
Chen Jialiang, Lu Pan, Wang Luyan, et al. Rapid detection of SXT element in *Vibrio cholerae* using recombinase polymerase amplification technology [J]. China Preventive Medicine, 2022, 23(9): 705–708.

[57] 李达容. 水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌 RAA-LFD 快速检测方法的建立与应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022: 63.
Li Darong. Establishment and application research of RAA-LFD rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic products [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022: 63.

[58] 秦爱, 李根容, 邓方进, 等. 多重重组酶介导等温扩增技术检测食品中 3 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(5): 97–104.
Qin Ai, Li Genrong, Deng Fangjin, et al. Determination of 3 kinds of foodborne pathogens in food by multiplex recombinase aided amplification technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(5): 97–104.

[59] 李盛杰, 江海涛, 吴雨龙. 基于 MIRA 技术的霍乱弧菌胶体金试纸条快速检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(24): 167–171.
Li Shengjie, Jiang Haitao, Wu Yulong. Establishment of rapid detection method of *Vibrio cholerae* colloidal gold test strip based on MIRA technology [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(24): 167–171.

[60] 李盛杰, 江海涛. 多酶恒温核酸快速扩增技术在霍乱弧菌检测中的应用[J]. 南京晓庄学院学报, 2021, 37(6): 49–52.
Li Shengjie, Jiang Haitao. Application of multi-enzyme isothermal rapid amplification in the detection of *Vibrio cholera* [J]. Journal of Nanjing Xiaozhuang University, 2021, 37(6): 49–52.

[61] 丁卫平, 张士财, 伊廷存, 等. 霍乱弧菌O1群与O139群产毒株多酶恒温快速扩增检测方法的建立[J]. 现代预防医学, 2024, 51(4): 705–712.
Ding Weiping, Zhang Shicai, Yi Tingcun, et al. Establishment of multienzyme isothermal rapid amplification method for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 toxigenic strains [J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51(4): 705–712.

[62] Yin Weihong, Zhuang Jianjian, Li Jiale, et al. Digital recombinase polymerase amplification, digital loop-mediated isothermal amplification, and digital CRISPR-cas assisted assay: current status, challenges, and perspectives [J]. Small, 2023, 19(49): e2303398.

[63] Reynolds J, Loeffler R S, Leigh P J, et al. Recent uses of paper microfluidics in isothermal nucleic acid amplification tests [J]. Biosensors, 2023, 13(9): 885.

[64] Harris J B, Laird M D, Chen A, et al. Molecular diagnostics for *Vibrio* cholerae [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(2): e00086–17.

[65] Alam M, Islam M S, Ahmed S, et al. Persistence of *Vibrio* cholerae DNA in stool after successful antimicrobial treatment [J]. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2025, 19(3): e0011268.

[66] Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, et al. Diagnostic techniques for

rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139 [J]. Vaccine, 2020, 38: A73–A82.

[67] Muzembo B A, Kitahara K, Ohno A, et al. Cholera rapid diagnostic tests for the detection of *Vibrio cholerae* O1: an updated meta-analysis [J]. Diagnostics, 2021, 11(11): 2095.

[68] Mukherjee P, Ghosh S, Ramamurthy T, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick kit for diagnosis of cholera emphasizes its outbreak utility [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2010, 63(4): 234–238.

[69] Xue Yuanyuan, Abdullah Al M, Chen Huihuang, et al. Relic DNA obscures DNA-based profiling of multiple microbial taxonomic groups in a river-reservoir ecosystem [J]. Molecular Ecology, 2023, 32(17): 4940–4952.

[70] 徐潇, 阚飙. 活的非可培养状态霍乱弧菌研究进展[J]. 疾病监测, 2010, 25(3): 222–225.
Xu Xiao, Kan Biao. The viable but nonculturable state of *Vibrio cholerae* [J]. Disease Surveillance, 2010, 25(3): 222–225.

[71] Wu Bin, Liang Weili, Kan Biao. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae* [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 404.

[72] Hossain Z Z, Farhana I, Tulsiani S M, et al. Transmission and toxigenic potential of *Vibrio cholerae* in hilsha fish (*Tenualosa ilisha*) for human consumption in Bangladesh [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 222.

[73] Zhao Shuo, Zhang Jingyun, Li Zhe, et al. Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR combined with propidium monoazide treatment [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 753078.

[74] Hongsibsam T, Prasertsopon J, Siripurkpong P, et al. Comparative evaluation of viability PCR reagents highlights the superior efficacy of PMAxx azo dye for bacterial and viral viability discrimination using real-time and digital PCR [J]. Microbiology Spectrum, 2026, 14(4): e0400225.

[75] Kanoktippornchai B, Chomvarin C, Engchanil C, et al. Triplex reverse transcription-PCR for detecting viable toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand [J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2014, 45(2): 375–382.

[76] 陈曦, 闫梅英, 文远汐, 等. 基于噬菌体核酸检测霍乱弧菌的TaqMan-qPCR方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(8): 97–104.
Chen Xi, Yan Meiying, Wen Yuanxi, et al. Establishment of a direct phage DNA detection-based TaqMan-qPCR method for *Vibrio cholerae* identification [J]. China Biotechnology, 2024, 44(8): 97–104.

[77] Nelson E J, Grembi J A, Chao D L, et al. Gold standard cholera diagnostics are tarnished by lytic bacteriophage and antibiotics [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(9): e00412–e00420.

[78] 王敏, 李娜, 张伟. 近岸海水微生物耐药基因高通量qPCR检测研究[J]. 环境科学, 2021, 42(8): 3711–3719.
Wang Min, Li Na, Zhang Wei. High-throughput qPCR detection of antimicrobial resistance genes in nearshore seawater [J]. Environmental Science, 2021, 42(8): 3711–3719.

[79] Falconer J, Diaconu K, O'May F, et al. Cholera diagnosis in human stool and detection in water: A systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2022, 17(7): e0270860.

[80] 周艳, 张立实, 吴永宁. 海水环境样本 PCR 扩增抑制因素及去除技术研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2019, 36(5): 458–463.
Zhou Yan, Zhang Lishi, Wu Yongning. Research progress on PCR amplification inhibitors and removal techniques in seawater environmental samples [J]. Journal of Environment and Health, 2019, 36(5): 458–463.

[81] Kim H, Lee J, Park S. Inhibitory effect of seawater constituents on conventional PCR amplification of *Vibrio* nucleic acid [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(8): 2891–2896.

[82] 陈炯, 屠丽红, 陈艳新, 等. 微流体芯片技术检测食源性致病菌的应用研究[J]. 上海预防医学, 2014, 26(6): 330–334.
Chen Jiong, Tu Lihong, Chen Yanxin, et al. Lab-on-chip for the detection of food borne pathogenic bacteria [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2014, 26(6): 330–334.

[83] 刘李, 李娟, 王强, 等. 微流控芯片核酸快速检测技术研究进展[J]. 分析化学, 2024, 52(11): 18408–18415.
Liu Li, Li Juan, Wang Qiang, et al. Research progress on rapid nucleic acid detection technology of microfluidic chip [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2024, 52(11): 18408–18415.

[84] 刘建礼, 高静, 蒋鹏翀, 等. 中东呼吸综合征冠状病毒微流控芯片自动检测方法建立[J]. 中国公共卫生, 2023, 39(1): 92–97.
Liu Jianli, Gao Jing, Jiang Pengchong, et al. Establishment of an automatic detection method for Middle East respira-Tory syndrome coronavirus with an integrated microfluidic chip [J]. Chinese Journal of Public Health, 2023, 39(1): 92–97.

[85] 康洁, 刘建礼, 贾欣月, 等. 一种霍乱弧菌检测引物探针组合物及一体化微流控芯片试剂盒: CN202210533351.3[P]. 2023-10-20.
Kang Jie, Liu Jianli, Jia Xinyue, et al. A primer-probe composition for detecting *Vibrio cholerae* and an integrated microfluidic chip kit: CN202210533351.3 [P]. 2023-10-20.

[86] 鲁艳, 张森, 张锋, 等. 分离富集磷酸化/糖基化蛋白质/肽的磁固相萃取新材料[J]. 分析测试学报, 2025, 44(1): 1–11.
Lu Yan, Zhang Sen, Zhang Feng, et al. Magnetic solid phase extraction materials for separation and enrichment of phosphoproteins/peptides and glycoproteins/peptides [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2025, 44(1): 1–11.

[87] 陈艳, 刘军, 李娜. 微流控核酸提取检测一体化装置研究进展[J]. 医疗卫生装备, 2024, 45(7): 89–95.
Chen Yan, Liu Jun, Li Na. Research progress on integrated device for microfluidic nucleic acid extraction and detection [J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2024, 45(7): 89–95.

[88] 王晨, 李恺, 闵乾昊. 便携式微器件偶联质谱技术在生物检测中的研究进展[J]. 分析化学, 2022, 50(11): 1685–1698.
Wang Chen, Li Kai, Min Qianhao. Advances in portable microdevice coupled mass spectrometry for biological detection [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2022, 50(11): 1685–1698.

[89] 黄琴, 黄乐阳, 靳翔宇, 等. 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统与精准医疗应用[J]. 中国激光, 2024, 51(9): 0907013.
Huang Qin, Huang Leyang, Jin Xiangyu, et al. Fully integrated nucleic acid analysis system based on syringe-microfluidic chip and application of precision medicine [J]. Chinese Journal of Lasers, 2024, 51(9): 0907013.

[90] 吴妍, 张晓, 张良, 等. 水体中致病菌富集和核酸提取方法及优化[J]. 中国公共卫生, 2023, 39(11): 1496–1500.
Wu Yan, Zhang Xiao, Zhang Liang, et al. Membrane filtration enrichment and optimization of nucleic acid extraction for qPCR detection of

pathogenic bacteria in water-an experiment with *Mycobacterium abscessus* tester strain [J]. Chinese Journal of Public Health, 2023, 39(11): 1496–1500.

[91] 闫帅, 崔春萍, 秦伟捷, 等. 甲醇介导的多膜集成过滤装置用于多组学样品的快速制备[J]. 质谱学报, 2026, 47(3): 514–526.
Yan Shuai, Cui Chunping, Qin Weijie, et al. 3M-filter: rapid and integrated methanol-mediated multi-omics sample preparation *via* filter [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2026, 47(3): 514–526.

[92] 张岚, 李红, 王鑫. 水环境中病原微生物现场快速检测技术应用进展[J]. 中国环境监测, 2024, 40(1): 1–8.
Zhang Lan, Li Hong, Wang Xin. Application progress of on-site rapid detection technology for pathogenic microorganisms in water environment [J]. Environmental Monitoring in China, 2024, 40(1): 1–8.

[93] 刘一辰, 赵茹健, 吕佰阳, 等. 基于 CRISPR/Cas 技术的传染性病原精准便携化检测系统[J]. 分析化学, 2024, 52(2): 187–197.
Liu Yichen, Zhao Rujian, Lü Baiyang, et al. A precise and portable detection system for infectious pathogens based on CRISPR/cas technology [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2024, 52(2): 187–197.

[94] 白净卫, 李寅青, 刘鹏. 一体化自助式核酸检测卡盒的研发与应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(3): 1023–1035.
Bai Jingwei, Li Yinqing, Liu Peng. Research and development and application of integrated self-service nucleic acid detection cartridge [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(3): 1023–1035.

[95] Ke Z L, Pang B, Yang J S, et al. Emergence and prevalence of *Vibrio cholerae* O1 sequence type 75 clonal complex, Fujian Province, China, 2009—2023 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2025, 31(7): 1428–1431.

[96] Foster-Nyarko E, Able-Thomas S, Adade N E, et al. Genomic diversity and antimicrobial resistance of *Vibrio cholerae* isolates from Africa: a PulseNet Africa initiative using nanopore sequencing to enhance genomic surveillance [J]. Microbial Genomics, 2025, 11(12): 001586.

[97] 徐志彬, 许昊, 王刚, 等. 人工智能辅助荧光 PCR 与等温扩增信号判读技术进展[J]. 分析测试学报, 2026, 45(2): 289–297.
Xu Zhibin, Xu Hao, Wang Gang, et al. Research progress on artificial intelligence-assisted signal interpretation technology of fluorescent PCR and isothermal amplification [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2026, 45(2): 289–297.

[98] 潘明飞, 李慧琳, 胡晓春, 等. 机器学习在病原微生物检测试剂设计中的应用[J]. 食品科学, 2025, 46(18): 301–308.
Pan Mingfei, Li Huilin, Hu Xiaochun, et al. Application of machine learning in the design of pathogenic microorganism detection reagents [J]. Food Science, 2025, 46(18): 301–308.

[99] 陈阳, 刘鑫, 张悦, 等. 人工智能结合测序技术的病原菌毒力基因分型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2025, 45(7): 521–527.
Chen Yang, Liu Xin, Zhang Yue, et al. Study on pathogen virulence gene typing combining artificial intelligence and sequencing technology [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2025, 45(7): 521–527.

[100] 梁好, 贾诗雨, 詹州, 等. 纳米酶联合核酸适配体用于食源性致病菌检测研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2025, 56(5): 1251–1259.
Liang Hao, Jia Shiyu, Zhan Zhou, et al. Advances in nanozyme-aptamer systems for the detection of foodborne pathogens [J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2025, 56(5): 1251–1259.

(责任编辑: 蔡世佳 曹岱琳)